И.М.Грачева, Н.Н.Гаврилова, Л.А.Иванова

ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЖИРОВ

И.М.Грачева, Н.Н.Гаврилова, Л.А.Иванова

ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЖИРОВ

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебника для студентов вузов, обучающихся по специальности «Технология микробиологических производств»

МОСКВА · ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ · 1980

ББК 36
Г75
УДК 663.18 : 664 (075.8)

Грачева И. М., Гаврилова Н. Н., Иванова Л. А.
Г75 Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. — М.: Пищевая пром-сть, 1980. — 448 с.

В пер.: 1 р. 20 к.

В учебнике рассмотрены вопросы производства белковых препаратов, аминокислот и жиров микробного происхождения. Описаны технологические схемы их производства в зависимости от вида сырья, способов его подготовки и используемого штамма микроорганизма — продуцента биологически активных веществ.

Рассмотрены вопросы очистки сточных вод и охраны труда на предприятиях, занимающихся производством микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров.

Г $\frac{31709-003}{044(01)-80}$ 3—80. 2910000000

ББК 36
6П.8

Рецензенты: кафедра биохимии и технологии микробиологических производств Уфимского нефтяного института (канд. хим. наук, доцент ХЛЕСТКИН Р. Н.), д-р техн. наук, проф. СМИРНОВ В. А. (Ленинградский межотраслевой научно-исследовательский институт пищевой промышленности)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ III
ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ

ЧАСТЬ IV

ТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ

ЧАСТЬ V

ОХРАНА ТРУДА И ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ПО ПРОИЗВОДСТВУ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЛИПИДОВ

Ирина Михайловна Грачева
Нина Николаевна Гаврилова
Людмила Афанасьевна Иванова

ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЖИРОВ

Редактор И. П. Вейшторд
Художник Е. Н. Волков
Художественный редактор В. А. Чуракова
Технический редактор Л. И. Кувыркина
Корректоры В. Б. Грачева, Н. П. Багма

ИБ № 1252

Сдано в набор 17.12.79. Подписано в печать 02.07.80. Т-08671. Формат 84×108[1]/32. Бумага типографская № 2. Литературная гарнитура. Высокая печать. Объем 14,0 печ. л. Усл. печ. л. 23,52. Уч.-изд. л. 24,70. Тираж 4500 экз. Заказ 212. Цена 1 р. 20 к.

Издательство «Пищевая промышленность», 113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

Владимирская типография «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7



ВВЕДЕНИЕ

Задолго до того, как человек узнал о существовании микроорганизмов, они широко использовались им в самых разнообразных процессах: пивоварении, виноделии, хлебопечении и т. д. Значение и роль микроорганизмов для различных производств были открыты в середине прошлого столетия Л. Пастером, но только начиная с 30—40-х годов нашего столетия, когда знания о физиологии и закономерностях роста микроорганизмов значительно пополнились, появилась реальная возможность сделать их неисчерпаемым источником получения биологически активных веществ: белков, аминокислот, витаминов, липидов, ферментов, антибиотиков и т. д.

Учитывая, что уже сейчас мировой дефицит белка составляет по самым оптимистическим подсчетам около 5—8 млн. т., а продуктов питания —40—60 млн. т (по данным продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН—ФАО), необходимо было найти новые источники их получения, так как ликвидировать такой дефицит только за счет расширения посевных площадей, увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур и поголовья скота не представляется возможным. Таким новым источником стали, в частности, микроорганизмы, растущие на различных углеродсодержащих субстратах. Появилась принципиально новая отрасль—производство микробных масс на отходах переработки различного растительного сырья и других источниках углерода, стало возможным более полно и рационально использовать ранее нереализуемые отходы ряда производств.

Микроорганизмы способны накапливать огромные (до 60—70% от сухой массы) количества белков. Такая биомасса микробов может непосредственно использоваться в качестве прекрасного обогатителя кормов для животно-

водства и птицеводства или служить сырьем для получения очищенного белкового препарата.

Белки, содержащиеся в природных объектах (мясе, рыбе, молоке, овощах и др.), имеют различную питательную ценность. Для характеристики питательной ценности белков по предложению Комитета по белковым потребностям при Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) введено понятие «химической отметки», основанное на нормированном содержании незаменимых аминокислот в белке, которое принято за эталонное[1]. «Химическая отметка» наиболее распространенных сельскохозяйственных культур приведена в табл. 1.

Таблица 1

Источник получения белка	Содержание аминокислот (в % к аминокислотам «идеального» белка)			«Химическая отметка» белка
	метионин + + цистеин	лизин	триптофан	
Пшеница	39	22	35	22
Ячмень	37	29	35	29
Рис (полированный)	44	33	64	33
Кукуруза	44	23	22	22
Сорго	34	17	45	17

Большинство белков растений неполноценны, и дефицитной аминокислотой чаще всего является лизин. В белках животного происхождения имеет место дефицит по метионину, триптофану, лизину, изолейцину и тирозину.

Повысить питательную ценность и усвояемость традиционных продуктов питания человека, а также кормов для сельскохозяйственных животных можно введением недостающих незаменимых аминокислот и полноценных белков.

[1] В «идеальном» белке признано эталонным содержание четырех незаменимых аминокислот. Количество их установлено в граммах на 100 г «идеального» белка: лизина — 12,4; триптофана — 3,1; суммы метионина и цистеина — 10,8. При оценке полноценности любого белка в нем определяется содержание этих аминокислот в процентах по отношению к эталонному содержанию в «идеальном» белке. «Химическая отметка» данного белка устанавливается по процентному содержанию той аминокислоты, количество которой минимально.

Источниками получения белковых веществ могут быть продукты сельского хозяйства, органический синтез, биомассы микроорганизмов и их метаболиты.

Увеличения первого источника можно достичь путем расширения посевных площадей под зерновые и масличные культуры, повышения их урожайности, более эффективного и рационального использования отходов переработки растений, отходов мясо- и рыбоперерабатывающей промышленности, использования достижений науки в области селекции высокопродуктивных сортов растений и пород сельскохозяйственных животных, снижения за счет внедрения передовой технологии потерь белков при хранении и переработке урожаев.

Промышленное получение белков методом органического синтеза — дело будущего. Белки являются соединениями очень сложного состава и отличаются огромным разнообразием. Сотни лабораторий мира занимаются изучением состава и строения белков, но только для очень незначительного их количества установлены химический состав, структура и пространственная ориентация молекулы. Единицы белков синтезированы в лабораторных условиях. При производстве белков методом органического синтеза требуются уникальное оборудование, различные ферменты, чистейшие реактивы, α-аминокислоты, которые порой можно получить только путем многостадийного выделения из гидролизатов растительных или животных тканей. Поэтому сейчас это направление имеет лишь познавательное научное значение.

Третий источник получения белковых веществ — путем микробного синтеза — один из перспективных путей решения проблемы. Основное преимущество этого способа заключается в том, что скорость накопления биомассы микроорганизмов на несколько порядков выше, чем у растений и животных: микроорганизмы растут в 500 раз быстрее, чем самые урожайные сельскохозяйственные культуры, и в 1000—5000 раз быстрее, чем самые быстрорастущие породы сельскохозяйственных животных. Для получения микробных масс чаще всего используют дрожжевые микроорганизмы, которые при определенных условиях способны накапливать до 40—50% белка от своей массы, и некоторые бактерии, образующие до 60—70% белка.

Промышленное производство обогащенных белками микробных масс значительно менее трудоемко по сравнению с получением сельскохозяйственной продукции. Микроорганизмы выращивают в компактных автоматизированных установках, получение микробного белка не зависит от климата, плодородия почв, времени года и т. д., поэтому оно может быть организовано в любой географической точке земли. Кроме того, микробный белок (особенно дрожжевой) — «...это настоящий природный премикс, концентрат незаменимых аминокислот, витаминов, а также наиболее ценных для животных микроэлементов. Достаточно сказать, что с каждым миллионом тонн кормовых дрожжей сельское хозяйство получает 400—500 тыс. т переваримого белка, содержащего свыше 220 тыс. т незаменимых аминокислот, в том числе более 30 тыс. т лизина, 7,5 тыс. т метионина, 9 тыс. т цистеина, 12,5 тыс. т триптофана ...» [1].

Полноценность пищи для человека и кормов для сельскохозяйственных животных определяют помимо белков и содержащиеся в них незаменимые аминокислоты. Поэтому непосредственно к проблеме производства белковых препаратов примыкает проблема получения аминокислот в промышленных масштабах.

Аминокислоты можно получать химическим синтезом, гидролизом природных белков, микробиологическим синтезом и трансформацией предшественников аминокислот с помощью микроорганизмов или ферментов, выделенных из них.

Синтез целого ряда аминокислот химическим путем хорошо разработан и внедрен в производство. Во многих случаях такое производство экономически целесообразно. Однако в процессе химического синтеза преимущественно образуется трудно разделимая смесь *D*- и *L*-форм аминокислот.

Известно, что в подавляющем большинстве случаев *D*-форма аминокислоты не представляет физиологической ценности для человека и животных: она не включается в обмен веществ и не усваивается ими. Получается готовый продукт, обремененный балластом. Если же очищать продукт от *D*-формы, это приводит к значительному

[1] Беляев В. Д. Микробиологическая промышленность и перспективы ее развития. — Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева, 1972, т. XVII, № 5, с. 482—488.

удорожанию и усложнению производства соответствующей аминокислоты. Поэтому данное направление производства аминокислот необходимо еще совершенствовать.

Физиологически ценные *L*-формы аминокислот получают в промышленном масштабе путем кислотного или щелочного гидролиза природных белков. Наиболее приемлемым сырьем для данного процесса являются отходы различных производств, в том числе непищевых (например, кератинсодержащие отходы). Этот метод не лишен недостатков: высокая стоимость процесса гидролиза, сложность выделения определенной аминокислоты из смеси многих аминокислот гидролизата, неизбежное разрушение части аминокислот в процессе гидролиза и ограниченность сырьевых ресурсов. Но все же этот способ позволяет утилизировать в полезный продукт отходы непищевого сырья, а в некоторых случаях (например, для получения парентерального питания) является единственно возможным.

Получение аминокислот с помощью микробов основано на способности некоторых культур микроорганизмов, являющихся ауксотрофными мутантами, образовывать какую-то определенную аминокислоту, например лизин, глутаминовую кислоту, метионин, триптофан и т. д. Эти аминокислоты выделяются клеткой в питательную среду в больших количествах. Культуральная жидкость, обогащенная определенной аминокислотой, служит исходным материалом для получения очищенной аминокислоты либо после концентрирования или высушивания используется непосредственно как добавка в корма сельскохозяйственных животных.

Аминокислоты, синтезируемые микроорганизмами, имеют только *L*-форму, что является большим преимуществом способа. Микробиологическим путем получают в промышленных масштабах многие аминокислоты (особенно за рубежом, в нашей стране пока налажено производство только лизина). Микробный синтез аминокислот при наличии активного продуцента практически имеет неограниченные возможности. Для выращивания микробов используются отходы различных производств, что позволяет получать дешевый препарат для сельского хозяйства.

В настоящее время наметилась тенденция к комбинированию технологических процессов получения амино-

кислот, когда химическим синтезом получают предшественники аминокислот, а самые сложные превращения их в аминокислоты «возлагают» на биологические катализаторы — ферменты — или на микроорганизмы, их синтезирующие. Например, можно синтетически получить α,ε-диаминопимелиновую кислоту, затем воздействовать на нее микробной декарбоксилазой и получить лизин. Это направление только начинает развиваться, но, по-видимому, в будущем сочетание химического синтеза и биохимической трансформации явится наиболее перспективным направлением в производстве аминокислот.

С помощью микроорганизмов можно получать липиды. В настоящее время значительное количество растительных и животных жиров расходуется на технические нужды. Замена пищевых жиров микробными даст заметный экономический эффект.

Производство липидов с помощью микроорганизмов возможно по двум направлениям: специализированное производство, основанное на направленном биосинтезе липидов микробной клеткой, и получение отхода производства в виде микробного жира при получении кормовых дрожжей.

В производстве, где главным, целевым продуктом являются микробные липиды, микроорганизмы выращиваются при минимальном азотистом питании. В этом случае они накапливают значительные количества (до 20% от массы клетки) липидов, состав которых зависит от используемого источника углерода. В липидную фракцию входят фосфолипиды, стерины, свободные жирные кислоты, моно-, ди- и триглицериды, стериновые эфиры и воски. Липиды извлекают экстракцией, а оставшуюся биомассу используют как белковую добавку в корма животных, однако содержание белка в ней в 1,5—2,0 раза меньше, чем в обычных кормовых дрожжах.

При выращивании кормовых дрожжей на средах с повышенными концентрациями парафинов, на дизельном топливе в биомассе дрожжей накапливается значительное количество липидов, которые являются нежелательным компонентом в готовом продукте, так как они вызывают его прогоркание при хранении. Поэтому липиды из кормовых дрожжей экстрагируют, отработанные дрожжи высушивают, а жиры освобождают от растворителя и направляют на дальнейшую переработку.

Таким образом, с помощью микроорганизмов можно в неограниченном количестве получать важнейшие кормовые белковые добавки для животноводства и птицеводства. Синтезируемые микроорганизмами биологически активные вещества могут в перспективе быть обогатителями пищи человека. При промышленном накоплении микробных масс они становятся реальным, дешевым и доступным источником получения белковых препаратов, аминокислот и липидов.

Эти предпосылки легли в основу создания в нашей стране новой отрасли промышленности — микробиологической, которая объединила мелкие, разбросанные по отдельным отраслям промышленности микробиологические производства.

В связи с важностью этой проблемы в 1967 г. было создано Главное управление микробиологической промышленности при Совете Министров СССР, призванное решать вопросы производства различных продуктов микробного синтеза. За годы своего существования микробиологическая промышленность добилась больших успехов. Объем валовой продукции увеличился более чем в 4 раза. Удельный вес продукции для сельского хозяйства в общем объеме выпуска возрос на 58%. В 1978 г. промышленность дала животноводству в 15 раз больше кормовых дрожжей, чем в 1966 г.

В июле 1978 г. состоялся Пленум ЦК КПСС, который поставил новые задачи перед микробиологической промышленностью, связанные с интенсификацией сельского хозяйства, повышением его эффективности. В принятом ЦК КПСС и Советом Министров СССР постановлении «О дальнейшем развитии производства кормовых добавок, средств защиты растений и другой продукции микробиологической промышленности на 1978—1985 гг.» предусматривается выделение на дальнейшее развитие отрасли 2,9 млрд. руб. и ввод в действие мощностей по производству кормовых дрожжей (более 1 млн. т), аминокислот (20 тыс. т) и другой продукции.

Развитие промышленности неизбежно вызывает потребность в специалистах. С 1934 г. одновременно с рождением отечественной гидролизной промышленности в Ленинградской лесотехнической академии и затем в Ленинградском лесохимическом институте организуется

выпуск инженеров по специальности 0903 «Производство кормовых дрожжей на гидролизатах растений». Огромный опыт работы по подготовке кадров, пуску и освоению промышленных объектов позволил В. И. Шаркову, С. А. Сапотницкому, В. А. Смирнову, А. А. Андрееву, Л. И. Брызгалову, К. Д. Мартыненко, В. А. Ефимову и другим ведущим ученым и специалистам, имена которых широко известны как в нашей стране, так и за рубежом, создать прекрасные учебники и учебные пособия для студентов и работников гидролизного производства.

С развитием микробиологической промышленности, с возникновением новых направлений использования микроорганизмов в качестве продуцентов различных биологически активных веществ появилась необходимость подготовки специалистов других направлений микробиологии. В 1963 г. в Московском технологическом институте пищевой промышленности в рамках специальности 1015 организуется подготовка инженеров-технологов по технологии ферментных препаратов, а начиная с 1970 г. этот институт выпускает инженеров-технологов по всему перечню специализаций, входящих в специальность 1015: технология ферментных препаратов, технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров и технология биопрепаратов, органических кислот и растворителей. В 1970—1976 гг. организуется подготовка специалистов для микробиологической промышленности еще в шести вузах страны. Важно отметить, что почти везде основной упор сделан на подготовку инженеров-технологов, занимающихся технологией микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров. Использовать для подготовки инженеров-технологов по специальности 1015 только учебники и учебные пособия, предназначенные для специалистов гидролизного производства, не представляется возможным, так как древесные и растительные материалы, сульфитные щелоки — только часть сырья, используемого для выращивания кормовых дрожжей.

Настоящая книга является первой попыткой дать описание технологии микробных белковых препаратов и жиров на основе самого разнообразного сырья, а также изложить основные этапы получения аминокислот при культивировании микроорганизмов.

Задачами курса «Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров» являются изучение теоретических основ процессов производства биомасс микроорганизмов, выращиваемых на самом разнообразном сырье — гидролизатах древесины, сульфитных щелоках, гидролизатах растительных сельскохозяйственных отходов, отходах пищевой промышленности, жидких углеводородах, синтетических спиртах, природном газе и т. д., а также теория и практика дальнейшей переработки микробных биомасс на белковые или липидные препараты. Не менее важной задачей является изучение теоретических основ процессов производства аминокислот, получаемых микробиологическим путем.

Эта книга в первую очередь предназначена для студентов, обучающихся для последующей работы в качестве инженеров-технологов в микробиологической промышленности. Она может быть полезна для работников промышленности и отраслевых институтов.

При работе над учебником авторы встретили ряд трудностей, связанных с очень большим разнообразием продуктов микробного синтеза, с большим количеством порой противоречивых материалов, имеющихся в литературе, с еще не до конца установившейся технологией на действующих и пусковых предприятиях отрасли—все это, безусловно, не могло не сказаться на содержании книги. Поэтому авторы с благодарностью и признательностью примут все критические замечания и пожелания и учтут их в своей последующей работе по совершенствованию данной книги.

При подготовке рукописи к изданию большую помощь оказали профессор В. А. Смирнов, доцент Р. Н. Хлесткин, канд. хим. наук В. С. Минина, канд. биол. наук З. М. Зайцева и канд. хим. наук Ю. Е. Казанцев. Авторы выражают им самую искреннюю признательность и благодарность. При оформлении рукописи большая помощь была оказана коллективом кафедры «Технология микробиологических производств» Московского технологического института пищевой промышленности.

Часть I.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О МИКРООРГАНИЗМАХ, КИНЕТИКЕ ИХ РОСТА И МЕТАБОЛИЗМЕ

Микроорганизмы — мельчайшие животные и растительные организмы (грибы, дрожжи, бактерии) — очень сложные и весьма лабильные живые существа. Они сравнительно быстро размножаются и потому за короткое время способны накапливать значительные количества клеточной массы — биомассы. Эти два показателя — способность к быстрому накоплению биомассы и лабильность микроорганизма — являются важнейшими критериями в оценке продуктивности производственных культур и их пригодности для использования в заводских условиях. Первый показатель характеризует физиологическую способность данной культуры к быстрому росту и размножению, второй дает возможность направленно изменять те или иные признаки продуцента для усиления биосинтеза целевого продукта.

Все микроорганизмы объединяются общностью строения клетки и направленности обменных процессов, едиными закономерностями роста и развития при выращивании на различных средах и в различных аппаратах. Такие общие сведения о микроорганизмах и некоторых их свойствах и являются предметом изложения первой части книги.

Глава 1. МОРФОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Морфология и физиология — это науки, изучающие строение определенного организма, его обмен веществ и факторы, влияющие на весь процесс его жизнедеятельности. Это тесно связанные, очень обширные, но в то же вре-

мя самостоятельные разделы науки о живых существах. Изложить полно даже в общем виде основные положения этих наук очень сложно, и поэтому здесь будут даны только некоторые сведения по морфологии и физиологии микроорганизмов — продуцентов биологически активных веществ.

Конкретные данные по отдельным продуцентам приведены в соответствующих разделах книги при описании каждой определенной технологии.

§ 1. МИКРООРГАНИЗМЫ — ПРОДУЦЕНТЫ БЕЛКА, АМИНОКИСЛОТ И ЛИПИДОВ

В микробиологической промышленности используют большое количество самых различных штаммов микроорганизмов, продуцирующих биологически активные вещества: белки, аминокислоты, липиды. Но не каждый микроорганизм может быть использован для этих целей в промышленных условиях, а лишь те, которые обладают способностью под воздействием внешних факторов (состава среды, условий культивирования, температуры и т. д.) образовывать в больших количествах и преимущественно то соединение, которое является главным (целевым) продуктом данного производства. Такие микроорганизмы могут быть выделены из природных субстратов или же получены в лабораторных условиях путем направленной селекции и длительного отбора.

На каждом предприятии в зависимости от его профиля и с учетом особенностей перерабатываемого сырья используется один определенный микроорганизм или несколько культур микроорганизмов.

Эффективное культивирование микроорганизмов зависит от многих факторов и прежде всего от правильного выбора продуцента, обеспечивающего на данной питательной среде максимальную скорость роста (значительное накопление биомассы) и степень использования питательных веществ, т. е. обладающего способностью ассимилировать все питательные вещества с высоким экономическим коэффициентом[1]. Скорость роста определяет устойчивость данной культуры,

[1] Экономический коэффициент характеризуется отношением массы микроорганизмов к массе потребленных питательных веществ.

способность ее вытеснять менее урожайные организмы и противостоять микробной инфекции, попадающей в среду различными путями. Скорость роста микроорганизмов и степень использования ими питательных веществ среды определяют технико-экономические показатели производства.

Помимо физиологических особенностей тех или иных культур микроорганизмов эффективность их применения в производстве определяют величина клеток и их способность выделяться из среды при сепарировании и флотировании.

Продуценты белковых веществ

Продуцируемые микроорганизмами белки преимущественно концентрируются внутри клетки, лишь очень небольшое количество белка в виде ферментов клетка выделяет во внешнюю среду. Поэтому целевым продуктом производства белковых веществ является биомасса продуцента, а отходом — фильтрат культуральной жидкости.

Продуценты белка должны удовлетворять ряду требований: иметь минимальное время генерации; обладать способностью накапливать до 40—70% белка от своей массы, максимально усваивая питательные вещества среды; не должны выделять в среду токсические продукты метаболизма и сами должны быть непатогенными; иметь высокую устойчивость и выживаемость в нестерильных условиях выращивания; обладать способностью легко отделяться от жидкой фазы среды при сепарировании и флотировании.

В зависимости от состава питательной среды и источника углерода применяют различные продуценты белковых веществ (рис. 1).

Для получения белка на гидролизатах растительного сырья наиболее часто используют дрожжи рода Candida: C. utilis, C. tropicalis, C. guilliermondii, C. scottii; реже дрожжи рода Trichosporon.

Наиболее продуктивными штаммами (по биомассе и количеству белка) при их выращивании на гидролизатах и гидролизно-спиртовой барде являются Candida scottii (штаммы Кр-9, Кр-9в, Астр-1, Тул-1); Candida tropicalis (штаммы Л-2, Сясь-1, Кд-14, Ахм-1, Кп-1, Гб-1, СД-5);

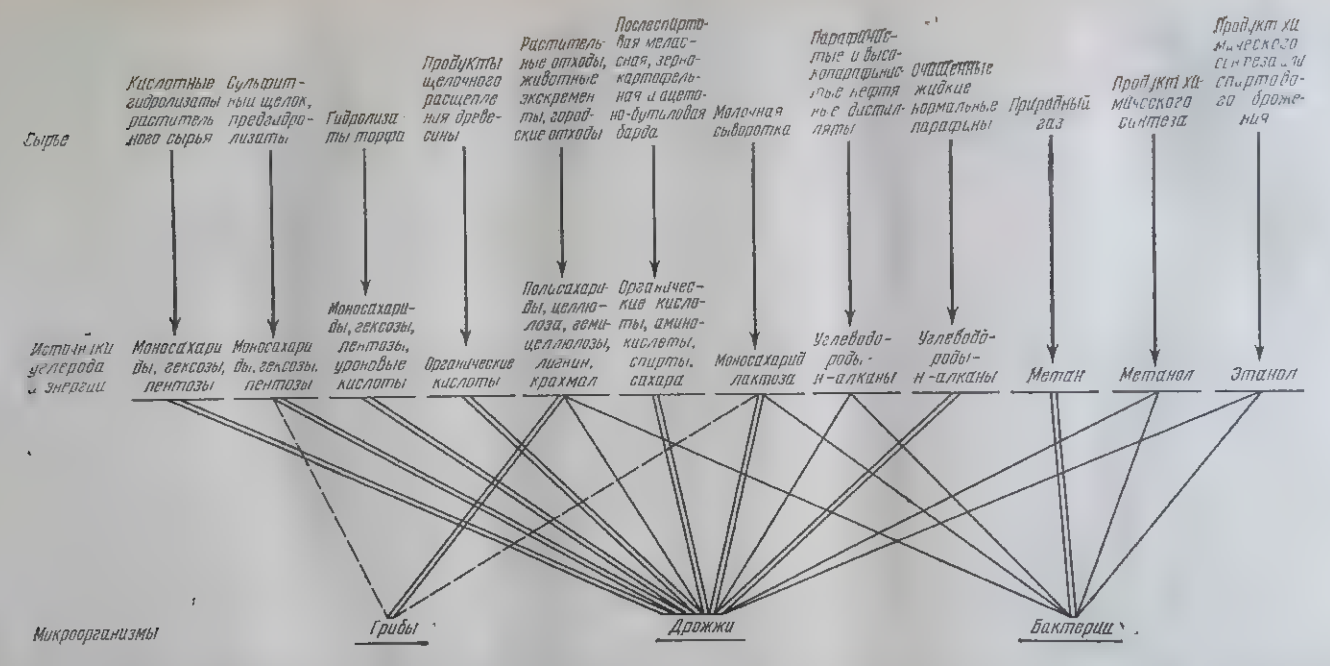


Рис. 1. Схема использования различными микроорганизмами источников углерода и энергии для продуцирования белковых веществ: ═══ -преимущественное использование; ——— —используют, но много реже, – – – – есть вероятность использования.

Candida utilis (штаммы Св-1, Тал-1) и некоторые другие культуры.

При выращивании микроорганизмов на сульфитных щелоках, а также на сульфитно-спиртовой барде используют дрожжи рода Candida, чаще всего C. utilis (штамм К-2) или C. tropicalis (штаммы Ск-4, Ск-5, Сов-2). В настоящее время применяют совместное выращивание двух культур, которые как бы дополняют друг друга, например Candida utilis штамм П-1 и Candida tropicalis штамм Сл-1.

На торфяных кислотных гидролизатах прекрасно развиваются дрожжи Candida tropicalis (штамм Сясь-1).

Жидкие углеводороды хорошо усваиваются дрожжами рода Candida, относящимися к следующим видам: C. tropicalis, C. guilliermondii, C. lipolytica, C. robusta, C. pelliculosa, C. scottii, C. rugosa. К углеводородпотребляющим микроорганизмам относятся также дрожжи родов Torulopsis и Rhodotorula: Torulopsis colliculosa, T. dattila, T. sake, T. famata, Rhodotorula glutinis, Rh. gracilis.

Газообразные углеводороды наиболее хорошо потребляются бактериями родов Mycobacterium и Pseudomonas. Эта способность найдена и у других групп бактерий и актиномицетов, относящихся к родам Actinomyces, Flavobacterium, Chromobacterium, Acremonium, Corynebacterium, Micrococcus и Staphylococcus.

К микроорганизмам—продуцентам белка, использующим в качестве источника питания метан и его газообразные гомологи, относятся Pseudomonas methanica, Ps. fluorescens, Ps. candatus, Mycobacterium phley, Myc. filiformae, Myc. vadosum, Myc. lacticolum, Myc. mycosum, Myc. luteum, Myc. perrugosum.

Многие микроорганизмы хорошо растут на кислородсодержащих соединениях, таких, как метиловый и этиловый спирты.

Для получения кормового белка на метиловом спирте наиболее перспективными продуцентами являются бактерии родов Pseudomonas и Methylomonas, а также дрожжи родов Candida и Hansenula. Наибольшее количество биомассы накапливают следующие виды дрожжей: Candida silvicola, C. boidinii, Hansenula polymorpha, Torula glabrota, T. ernobii и др. Среди бактерий следует

назвать Pseudomonas methanolica, Ps. rosea, Ps. M-27, Ps. AM-1, Ps. 135, Ps. C, Methylomonas methanolica и др.

На этиловом спирте выращивают дрожжи родов Candida, Debaryomyces, Endomycopsis, Hansenula, Mycoderma, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces, а также бактерии, принадлежащие к родам Acetobacter, Acinetobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Nocardia, Pseudomonas и др.

На отходах капролактама хорошо развиваются следующие микроорганизмы: Candida guilliermondii (штаммы Н-249, Щ-4, Лс-2), C. mycoderma (штамм Щ-1), C. sp. 6 и Trichosporon pullulans; на глицерине — C. tropicalis, C. rugosa, C. guilliermondii, Trichosporon cutaneum, C. intermedia, C. reukaufii; на феноле — C. tropicalis, Rhodotorula glutinis.

На мелассной и зерно-картофельной барде выращивают дрожжи C. tropicalis (штаммы Ск-4, Ск-5, Сх-2 и Дн-3) и C. utilis (штамм С-1).

На молочной сыворотке хорошо растут и накапливают значительное количество белка дрожжи и дрожжеподобные микроорганизмы Kluyveromyces lactis, Candida pseudotropicalis. Часть микроорганизмов (C. humicola, C. curvata. Trichosporon cutaneum) способны расти на этом субстрате только в результате окисления лактозы. С меньшим выходом по биомассе на молочной сыворотке можно выращивать дрожжи Cryptococcus aerius и Candida utilis.

Продуценты липидов

Продуцируемые микроорганизмами липиды накапливаются внутри клетки в виде запасных гранул. Количество липидов может достигать 65—70% от сухой массы клетки (Cryptococcus terricolus), обычно же при определенных условиях выращивания микроорганизмов липидов образуется от 35 до 55%. Но если в биомассе содержится и меньшее количество липидов, экономически целесообразно выделять их.

Требования при отборе микроорганизмов — продуцентов липидов—те же, что и для продуцентов белка, только вместо белка в клетке должны накапливаться липиды. Кроме того, ряд продуцентов в отличие от продуцентов белка (в частности, дрожжей) требуют асептических условий при выращивании.

Источником получения липидов может быть биомасса дрожжей (в основном рода Candida), накапливаемая при производстве белковых веществ, но содержащая повышенное количество жиров. Из такой дрожжевой биомассы жиры извлекаются экстракцией растворителями. При производстве микробных липидов как целевого продукта в качестве продуцентов используют дрожжи родов Cryptococcus, Rhodotorula, Candida, Sporobolomyces, Hansenula, Lipomyces, Trichosporon, Saccharomyces. Среди этой группы дрожжей наибольшей продуцирующей (по липидам) способностью обладают следующие виды: Cryptococcus terricolus, Rhodotorula gracilis, Rhodotorula glutinis, Lipomyces starkeyi, Lipomyces lipoferus, Trichosporon pullulans.

Продуценты аминокислот

Микроорганизмы, образующие аминокислоты, не накапливают их в клетке, а постоянно секретируют в питательную среду. Поэтому аминокислоты выделяют из фильтрата культуральной жидкости. Выращивание микроорганизмов ведется в стерильных условиях. Обычно продуцентами аминокислот являются ауксотрофные мутанты, способные в огромных количествах образовывать какую-то одну аминокислоту. В промышленных и опытно-промышленных масштабах производятся сейчас путем микробного синтеза три аминокислоты: лизин, глутаминовая кислота и триптофан.

Лизин образуют многие микроорганизмы: бактерии, актиномицеты, синезеленые водоросли, некоторые виды микроскопических грибов. В настоящее время промышленность располагает значительным количеством гомосеринзависимых мутантов, способных образовывать большие количества внеклеточного лизина. Они относятся к родам Brevibacterium, Micrococcus, Corynebacterium, Pseudomonas и Aerobacter. Основными видами этих бактерий являются Brevibacterium flavum, Br. ammoniagenes, Br. lactofermentum, Br. ketoglutaricum, Micrococcus glutamicus, Corynebacterium acetoglutamicum, Cor. hoogii, Cor. glutamicum, Cor. equi, Cor. acetophilum, Cor. hydrocarboclastus, Bacillus subtilis, E. coli, Azotobacter suis, Pseudomonas aeroginosa, Ps. ovalis, Aerobacter aerogenes, Aer. paraffineus.

У нас в стране в качестве продуцентов лизина используют Micrococcus glutamicus 95 и Т-3, который правильнее было бы называть Corynebacterium glutamucum, Micrococcus sp. E., Brevibacterium sp. 22 и 22-Л.

Продуцентами глутаминовой кислоты являются бактерии, относящиеся к различным родам: Arthrobacter (в литературе обычно называют Micrococcus и Brevibacterium), Bacillus, Pseudomonas, Mycobacterium, Corynebacterium, Aerobacter, Sarcina, Achromobacter. В качестве промышленных штаммов в производстве используются следующие виды бактерий: Micrococcus glutamicus, Br. flavum, Br. aminogenes, Br. divaricatum, Br. lactofermentum, Br. saccharolyticum, Br. kowasakii, Br. ketoglutamicum, Cor. petrophilum, Cor. lilium, Cor. callunae, Bacillus megatherium, B. cereus, B. subtilis, B. circulans, B. pumilus, B. anthracis, Mycobacterium ammoniaphilum, Mycob. salicinovorum, Mycob. flavum, Ps. fluorescens, Ps. cruciviae.

Триптофан образуют микроорганизмы бактериального и грибного происхождения: Aerobacter aerogenes, Escherichia coli, B. megaterium, B. subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis, Neurospora crassa, Hansenula anomala, Endomyces magnusii, Serratia marcescens. Наиболее активными продуцентами *L*-триптофана являются представители рода Micrococcus (Micrococcus luteus, M. lysodeikticus), а также C. utilis и B. subtilis.

§ 2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О КЛАССИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Весь органический мир (по А. Л. Тахтаджяну)[1] можно разделить на 2 **надцарства:** доядерные организмы (Procaryotae) и ядерные организмы (Eucaryota). Каждое надцарство имеет в своем составе ряд **царств.**

Доядерные организмы, или прокариоты, относятся к царству Дробянок, или Procaryotae, а ядерные организмы, или эукариоты, относятся к трем царствам: Животные, Грибы (или Mycota), Растения.

Организмы, относящиеся к прокариотам и эукариотам, существенно различаются по своему строению и свойствам. У прокариотов нет четко выраженного ядра, ядерной мембраны, четко оформленных митохондрий; строе-

[1] Жизнь растений/[Тахтаджян А. Л., Жуковский Л. Н., Красильников Н. А. и др.]. М., 1977, т. 1. — 487 с.

ние клеточной стенки очень своеобразное, свойственное только этим организмам. У эукариотов есть ядро с ядерной мембраной, ядрышко, митохондрии и целый ряд других структур.

Микроорганизмы согласно приведенной выше классификации относятся к двум царствам: Дробянок и Грибов, т. е. микроорганизмы могут быть как прокариотами (например, бактерии), так и эукариотами (например, дрожжи).

Царство Procaryotae имеет два основных **класса**: Photobacteria (типовой класс) — фотосинтезирующие бактерии и Scotobacteria — нефотосинтезирующие бактерии.

В наиболее полном и современном определителе прокариотов[1] все они условно разделены на 19 групп: 1 — фототрофные; 2 — скользящие; 3 — хламидобактерии; 4 — почкующиеся (или стебельковые); 5 — спирохеты; 6 — спиральные (изогнутые); 7 — грамотрицательные аэробные палочки и кокки; 8 — грамотрицательные факультативно анаэробные бактерии; 9 — грамотрицательные анаэробные бактерии; 10 — грамотрицательные кокки и коккобациллы; 11 — грамотрицательные анаэробные кокки; 12 — грамотрицательные хемолитрофные бактерии; 13 — метанобразующие бактерии; 14 — грамположительные кокки; 15 — палочки и кокки, образующие эндоспоры; 16 — грамположительные аспорогенные палочковидные бактерии; 17 — актиномицеты и родственные организмы (группа коринебактерий); 18 — риккетсии; 19 — микоплазмы.

Среди этих групп бактерий наибольшую практическую значимость для производства белковых веществ и аминокислот имеют 7-я и 17-я, которые включают в себя продуценты белка на газообразных углеводородах и продуценты аминокислот (роды Corynebacterium, Arthrobacter, Pseudomonas и др.).

Царство Mycota подразделяется на два **отдела**: Mycomycota и Eumycota. Наибольший практический интерес для микробиологической промышленности представляет отдел грибов Eumycota, в котором различают шесть основных классов: Chytridiomycetes, Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes и Deuteromycetes. Для получения микробных белковых препаратов используются в основном дрожжевые и дрожжеподобные представи-

---

[1] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology., William Wilkins Co. — Baltimore, 1974. — 1226 p.

тели отдела Eumycota, относящиеся к трем классам: Ascomycetes, Basidiomycetes и Deuteromycetes. Чаще всего для получения белковых веществ и липидов в качестве промышленных штаммов используют различные виды грибов рода Candida.

Род Candida очень обширен и разнообразен. Он объединяет более 100 видов микроорганизмов. Род Candida входит в класс несовершенных грибов Deuteromycetes. Следует отметить, что в настоящее время для многих представителей рода Candida обнаружены совершенные аналоги среди аскоспоровых и базидиальных грибов (табл. 2) *. Такие совершенные формы можно найти также в родах Hansenula, Filobasidium, Stephanoascus, Pichia, Leucosporidium, Saccharomyces и др.

Микроорганизмы различают также в зависимости от их физиологических особенностей (основной источник углерода, энергии и т. д.).

Все микроорганизмы в зависимости от типа потребляемого источника углерода разделяются на автотрофные, способные усваивать в качестве единственного источника углерода углекислый газ, и гетеротрофные, получающие углерод в виде готовых органических соединений. Продуценты белков, аминокислот и липидов относятся преимущественно к гетеротрофам, исключением являются синезеленые водоросли, которые относятся к автотрофам и используются в промышленности для получения кормового белка.

Используемый источник энергии также позволяет подразделить микроорганизмы на две группы: фототрофы и хемотрофы. Фототрофы, например синезеленые водоросли, в качестве источника энергии используют свет, а хемотрофы— энергию, выделяемую в результате окислительно-восстановительных реакций. Подавляющее большинство микроорганизмов, применяемых для производства белковых веществ, аминокислот и липидов, являются хемотрофами, у которых донаторами электронов в ходе окислительно-восстановительных реакций служат сложные органические вещества, т. е. они хемоорганотрофы, или, как чаще их называют, гетеротрофы.

В свою очередь хемотрофы подразделяются на аэробы, которые используют в качестве конечного акцепто-

---

* Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. М., 1979. — 120 с.

Таблица 2

Несовершенная форма	Совершенная форма
C. bimundalis var. americana	Hansenula bimundalis var. americana
C. bimundalis var. bimundalis	H. bimundalis var. bimundalis
C. capsuligena	Filobasidium capsuligenum
C. chodatii	Hyphopichia burtonii
C. ciferrii	Stephanoascus ciferrii
C. fabianii	H. fabianii
C. guilliermondii pro parte	Pichia guilliermondii
C. guilliermondii var. membranaefaciens	P. ohmeri
C. ingens	P. humboldtii
C. krusei	P. kudriavzevii
C. lipolytica	Saccharomycopsis lipolytica
C. norvegensis pro parte	P. norvegensis
C. pelliculosa	H. anomala var. anomala
C. pelliculosa var. cylindrica	H. anomala var. schnegii
C. philogaea	P. philogaea
C. pulcherrima	Metschnikowia pulcherrima
C. reukaufii	M. reukaufii
C. robusta	Saccharomyces cerevisiae
C. scottii	Leucosporidium scottii
C. silvicola	H. holstii
C. sorbosa	P. kudriavzevii
	Предполагаемые совершенные формы
C. frigida	Leu. frigidum
C. gelida	Leu. gelidum
C. lambica	P. fermentans
C. macedoniensis	Kluyveromyces marxianus
C. melinii	H. wingei
C. nivalis	Leu. nivalis
C. parapsilosis	Lodderomyces elongisporus
C. pseudotropicalis	Kl. fragilis
C. shehatae	P. stipitis
C. utilis	H. jadinii
C. valida	P. membranaefaciens

ра электронов молекулярный кислород, и *анаэробы*, которые переносят электроны на другие соединения, кроме молекулярного кислорода.

Подавляющее большинство интересующих нас микроорганизмов относятся к *аэробным гетеротрофам*.

§ 3. СТРОЕНИЕ МИКРОБНОЙ КЛЕТКИ

Прокариотические и эукариотические микроорганизмы существенно различаются по строению клетки и функциям отдельных клеточных структур и органоидов. Эти различия накладывают отпечаток на все физиологические отправления микробной клетки. Продуценты белков, аминокислот и жиров относятся как к эукариотам, так и к прокариотам.

Эукариотическая клетка

Строение эукариотической клетки рассмотрим на примере дрожжевой клетки. Такой выбор обусловлен тем, что, с одной стороны, это наиболее изученный микробный эукариотный организм, с другой — дрожжи широко используются при производстве белковых веществ и липидов.

Эукариотическая клетка (рис. 2) состоит из цитоплазмы, имеющей сложное строение, которая заключена в многослойную клеточную стенку.

Клеточная стенка — весьма прочная эластичная перегородка, отделяющая внутреннее содержимое клетки от внешней среды. Она занимает существенную долю в массе клетки (15—30% по сухой массе) и имеет толщину от 150 до 280 нм. Клеточная стенка состоит на 60—70% из гемицеллюлоз, которые почти в равных долях представлены маннаном и глюканом. В состав стенки клетки входят также хитин, белок, липиды и минеральные соединения.

Клеточная стенка многослойна, она состоит чаще всего из трех слоев, но их число может возрастать до 10 и выше. Наружный слой — это гладкая липопротеидная мембрана толщиной 10—30 нм, следующий слой — фибриллярный, состоит из маннанопротеинового комплекса

и имеет толщину до 100 нм. Третий слой может быть фибриллярным или гомогенным; в зависимости от условий культивирования и вида дрожжей толщина его варьирует от 10 до 250 нм. Он состоит преимущественно из глюкана, молекулы которого упакованы в несколько рыхлых слоев, что часто имитирует дополнительные слои в оболочке.

Хитин в дрожжах, по мнению большинства исследователей, не образует сплошного слоя, а локализуется в области почечных рубцов в виде колец.

Клеточная стенка не только отделяет содержимое клетки от внешней среды, она выполняет важнейшую функцию регуляции проницаемости. В дрожжевой клеточной стенке отмечены две зоны избирательной проницаемости, которая зависит от химических свойств транспортируемых соединений (солей и других низкомолекулярных веществ). Клеточная стенка имеет поры диаметром до 3,6 нм, через которые биополимеры с большой молекулярной массой поступают внутрь клетки или выделяются во внешнюю среду.

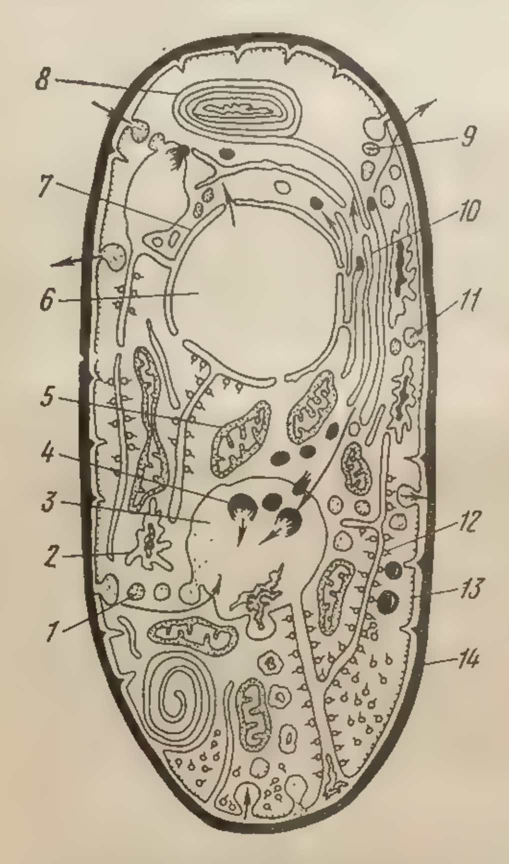


Рис. 2. Схема строения дрожжевой клетки:

1 — пиноцитозный пузырек; *2* — гладкий и *12* — шероховатый эндоплазматический ретикулум; *3* — вакуоль; *4* — липидные включения; *5* — митохондрия; *6* — ядро; *7* — ядерная мембрана; *8* — сегрегационная гранула; *9* — выделительные пузырьки; *10* — мембраны аппарата Гольджи; *11* — фагосома; *13* — цитоплазматическая мембрана; *14* — клеточная стенка.

В клеточной стенке, а также между стенкой и цитоплазматической мембраной, по-видимому, содержатся различные ферменты, транспортные белки и другие соединения, участвующие в процессах ассимиляции и диссимиляции.

Цитоплазматическая мембрана (плазмалемма) располагается непосредственно за клеточной стенкой. Она со-

стоит из трех слоев липопротеидов и имеет толщину около 8 нм. Поверхность мембраны может быть гладкой или иметь выпячивания (инвагинации). С помощью электронной микроскопии установлено, что инвагинации цитоплазматической мембраны достигают в длину 300 нм, в ширину около 30 и глубину — от 2 до 5 нм. Количество инвагинаций, их размеры и форма зависят от вида организма и его физиологического состояния. Более глубокие выпячивания цитоплазматической мембраны у дрожжей по своей структуре близки к мезосомам, количество их возрастает с ухудшением условий обитания дрожжей, с уменьшением содержания питательных веществ в среде, с накоплением в ней продуктов обмена.

На поверхности плазмалеммы дрожжей просматриваются в электронном микроскопе округлые структуры диаметром 10—11 нм. По-видимому, это ферменты, осуществляющие процесс синтеза клеточных стенок, гидролитические, окислительно-восстановительные ферменты, пермеазы и другие энзимы.

Цитоплазматическая мембрана регулирует процессы обмена веществ клетки. Она способна захватывать довольно большие капли углеводородов, липидов и белков — это явление называется *пиноцитозом*. Пиноцитирующая капля, по-видимому, переправляет поглощенные вещества через цитоплазму к вакуоли, где они обрабатываются ферментами и уже в приемлемом для клетки виде включаются в ее обмен веществ. Цитоплазматическая мембрана может также захватывать из среды твердые частицы — этот процесс носит название *фагоцитоза*. Кроме того, мембрана ответственна за экскрецию (выброс) в среду продуктов обмена клетки.

Цитоплазма — это внутреннее полужидкое, коллоидное содержимое клетки, ограниченное цитоплазматической мембраной. Цитоплазма клетки находится в движении, что способствует перемещению растворенных в ней веществ от одних органелл к другим. Чем моложе клетка, тем более подвижна в ней цитоплазма.

Цитоплазма содержит большое количество растворенных белков (ферментов), аминокислот, углеводов, минеральных веществ, витаминов, жиров и т. д. В ней находятся все клеточные органоиды: эндоплазматический ретикулум, рибосомы, аппарат Гольджи, лизосомы,

вакуоли, митохондрии и, наконец, ядро. Полужидкая коллоидная масса клетки под электронным микроскопом просматривается в виде тончайшей сети нитевидных глобулярных структур.

Эндоплазматический ретикулум — это мембранная система, имеющая вид пузырьков, канальцев, цистерн и контактирующая с цитоплазматической мембраной и ядром. Он состоит преимущественно из липопротеидов, липиды (в основном фосфолипиды) составляют приблизительно 50% по массе. Эндоплазматический ретикулум в клетке дрожжей развит не очень сильно, полости канальцев, пузырьков и цистерн имеют неопределенные размеры, которые зависят от физиологического состояния клетки и условий ее обитания. Так, ретикулум увеличивается по объему, если дрожжи перенести из анаэробных условий в аэробные или если в среду ввести трудноусвояемые источники углерода, например углеводороды. Вся эта система не имеет строго определенного места в цитоплазме, элементы ретикулума могут быть сосредоточены у цитоплазматической мембраны, в толще цитоплазмы или примыкать к ядру.

Эндоплазматический ретикулум бывает гладким и шероховатым. Дрожжи имеют преимущественно гладкий эндоплазматический ретикулум, он ответствен за углеводный и липидный обмен. Поверхность шероховатого эндоплазматического ретикулума незначительна, здесь концентрируются рибосомы и происходит синтез белка.

Рибосомы — это органоиды размерами от 15 до 20 нм, состоящие из нуклеопротеидов и распределенные по всей цитоплазме. Количество рибосом зависит от возраста клетки и условий ее обитания. Рибосомы могут деградировать или группироваться по нескольку штук в так называемые полирибосомы. Только определенный размер рибосомы и определенное ее состояние могут обеспечить нормальный синтез белка. Наиболее активно происходит синтез белков на рибосомах, когда они объединяются в полирибосомы.

Аппарат Гольджи представляет собой мембранное образование, состоящее либо из ряда пузырьков различного диаметра (от 15 до 90 нм), либо из пузырьков и нескольких дисковидных пластин, называемых диктиосомами. Наличие диктиосом приближает аппарат

Гольджи дрожжей к подобному в клетках у высших организмов. Диктиосомы располагаются параллельно и очень близко одна от другой. Мембраны в аппарате Гольджи упакованы достаточно плотно, расстояния между ними от 25 до 230 нм. Наиболее удаленные от центров участки диктиосом слегка утолщены и окружены большим количеством пузырьков различного размера, которые в процессе жизнедеятельности клетки отделяются от аппарата Гольджи и транспортируют определенные вещества к различным органоидам клетки.

Функции аппарата Гольджи в клетке до конца не изучены. Есть предположение, что он участвует в синтезе материала для формирования клеточных стенок, в процессе спорообразования, почкования дрожжей, является местом образования лизосом.

Лизосомы (это собирательное понятие) представляют собой различные клеточные структуры и образования, выполняющие различные функции: это «пищеварительные» гранулы, производные периферийных участков диктиосом, центральная вакуоль, где происходит расщепление удаляемых из клетки шлаков, вакуоли звездчатой формы, которые обволакивают (фагоцитируют) поврежденные органоиды цитоплазмы и «переваривают» их. К лизосомам относят сегрегационные гранулы, которые образуются в клетках под действием какого-либо повреждающего фактора. Характерной особенностью всех лизосом является наличие в них протеолитических и лизирующих ферментных систем.

У метилотрофных и парафинокисляющих дрожжей найдены и описаны также микротельца, названные *пероксисомами*, в которых локализованы ферменты, обладающие каталазной активностью.

Вакуоли являются производными эндоплазматического ретикулума либо аппарата Гольджи. В зависимости от происхождения вакуоли выполняют, по-видимому, различные функции. Они могут быть местом локализации запасных веществ клетки и клеточным образованием, в котором сосредоточиваются ненужные продукты обмена и токсические вещества, т. е. вакуоли принимают непосредственное участие в выделительной функции клетки.

Вакуоли отделены от цитоплазмы *липопротеидной мембраной*, на поверхности которой распола-

гаются ферменты. Количество и объемы вакуолей возрастают с увеличением возраста клетки.

Митохондрии — это замкнутые клеточные полиморфные структуры с многочисленными перегородками, возникающие в результате постепенной инвагинации цитоплазматической мембраны. Размеры митохондрий варьируют в широких пределах. Форма митохондрий может быть удлиненной, эллипсовидной или круглой. Эти органоиды ответственны за энергетический обмен клетки и в зависимости от энергонапряженности обмена в клетке внутренняя мембрана может иметь меньше (не напряженный обмен) или больше (энергонапряженный обмен) складок или трубочек (крист). Наружная мембрана митохондрий дрожжей очень прочна и однородна. Внутренняя мембрана неоднородна, к ней в большом количестве прикреплены грибовидные структуры, которые, по-видимому, являются местом сосредоточения ферментов, вероятнее всего, участвующих в процессе окислительного фосфорилирования. Внутренняя мембрана митохондрий, особенно кристы, более лабильна, чем внешняя.

Митохондрии — саморепродуцирующая система: они в процессе деления производят самостоятельно (независимо от репликации ядерной ДНК) репликацию митохондриальной ДНК при участии находящейся в них ДНК-полимеразы. В митохондриях обнаружен полный комплект синтезирующей белок системы. Считают, что эта система синтезирует структурные белки внутренней мембраны митохондрии и присущие этой мембране ферменты.

Ядро — важнейшее образование дрожжевой клетки, оно играет главную роль в передаче генетической информации, регулирует обмен веществ, отвечает за дифференциацию клетки, за синтез белка, липопротеидов, содержит хроматин, ответственный за процесс размножения клетки, контролирует образование клеточных структур и т. д. Впервые ядро дрожжей было описано в 1844 г., однако все многообразные функции этой важнейшей структурной единицы клетки еще до конца не изучены.

Ядро имеет преимущественно округлую форму, окружено нуклеолеммой, более плотная субстанция которой называется хромоцентром. В ядре дрожжей есть ядрышко, имеющее типичную фибриллярно-гранулярную структуру. По-видимому, в нем синтезируются и накап-

ливаются предшественники рибосом, которые затем транспортируются в цитоплазму клетки.

Ядро отделено от цитоплазмы двумя трехслойными мембранами. Эти мембраны скрепляются между собой около пор, которые могут быть открыты или закрыты. Состояние пор зависит от возраста клетки: чем клетка моложе, тем больше пор открыто, тем интенсивнее обмен. Вероятнее всего, поры служат для миграции из ядра в цитоплазму предшественников рибосом, информационной и транспортной РНК, осуществляя таким образом контроль за обменом веществ в клетке.

Между ядерными мембранами расположена *перинуклеарная зона* (от 10 до 500 нм), заполненная жидкостью, называемой *энхилемой*, которая не сообщается непосредственно ни с цитоплазмой, ни с нуклеоплазмой. Связь возможна только через полупроницаемые мембраны. На наружной стороне ядерной мембраны сосредоточено большое количество *рибосом*.

Основным составляющим ядра является *хроматин*, отличающийся большой устойчивостью. Его главный компонент — ДНК, которая находится в ядре в определенном соотношении с гистонами и проламинами.

В период перед митозом (размножением) весь хроматин концентрируется в *хромосомах*. Хромосомы, состоящие из молекул ДНК, являются хранилищем информации о свойствах клетки и синтезе всех белков, необходимых ей в течение жизни, за исключением белков митохондрий. При почковании или делении весь генный аппарат клетки удваивается, каждая клетка получает полный набор хромосом и вместе с ним всю сумму информации, обеспечивающую ее рост и развитие. В период деления ядра ядрышковой субстанции не обнаруживается. У дрожжей при расщеплении хромосом не наблюдается ресорбции ядерных мембран (явление эндомитоза). Количество хромосом в ядрах дрожжей зависит от родовых особенностей.

В зависимости от физиологического состояния дрожжевой клетки она может содержать различные **запасные вещества** в виде гранул или капель, которые расходуются клеткой в случае ухудшения условий обитания. Такими запасными веществами прежде всего являются волютин, липиды и гликоген. *Волютин* представляет собой комплекс рибонуклеиновой кислоты, белка, липи-

дов, полифосфатов и ионов магния и кальция, которые стабилизируют эту гранулу. Волютин может накапливаться в вакуолях и в самой цитоплазме. Гликоген — это полисахарид, который накапливается в дрожжах при избыточном углеводном питании чаще всего в анаэробных условиях, собираясь в плотно упакованные образования. При аэробном культивировании дрожжей гликоген образуется в виде мелких гранул без формирования плотных конгломератов или не образуется совсем. Липиды накапливаются в клетке в виде жировых капель или в соединении с белками и фосфатами, образуя гранулы.

Прокариотическая клетка

Наиболее характерным примером прокариотической клетки может служить бактериальная клетка. Изучением ультраструктурной организации бактериальной клетки занимались многие ученые, однако до настоящего времени нет четкого представления о строении бактериальной клетки в связи с очень малыми размерами объекта исследования, сложностью препаративных методов дифференциации отдельных клеточных структур и отсутствием единого методического подхода к решению этой проблемы. Поэтому можно говорить только о гипотетической схеме ее организации.

Прокариотическая клетка (рис. 3), так же как и эукариотическая, сверху покрыта достаточно жесткой клеточной стенкой, определяющей ее форму. К стенке клетки примыкает цитоплазматическая мембрана, а затем цитоплазма, в которой располагаются ядерный элемент, органоиды и запасные вещества клетки.

По составу и строению **клеточной стенки** бактерии делятся на две группы в зависимости от окраски по Граму: грамположительные и грамотрицательные.

Клеточная стенка грамположительных бактерий (рис. 4,*а*) однородна, состоит из мукополимеров. Они имеют в своем составе *N*-ацетилглюкозамин и *N*-ацетилмурамовую кислоту, которые связаны с диаминопимелиновой кислотой и аминокислотами с помощью пептидных связей. В свою очередь мукопептиды ковалентно связаны с тейхоевой кислотой, расположенной в периплазматическом пространстве между клеточной стенкой и мембраной. В мукопептидный слой входят бел-

ки, обладающие антигенным свойством. В клеточной стенке содержатся также липиды (приблизительно 1% от ее массы и в редких случаях — около 4%). Толщина клеточной стенки зависит от условий обитания и достигает 10—50 нм. Клеточная стенка составляет примерно 20% от массы всей клетки.

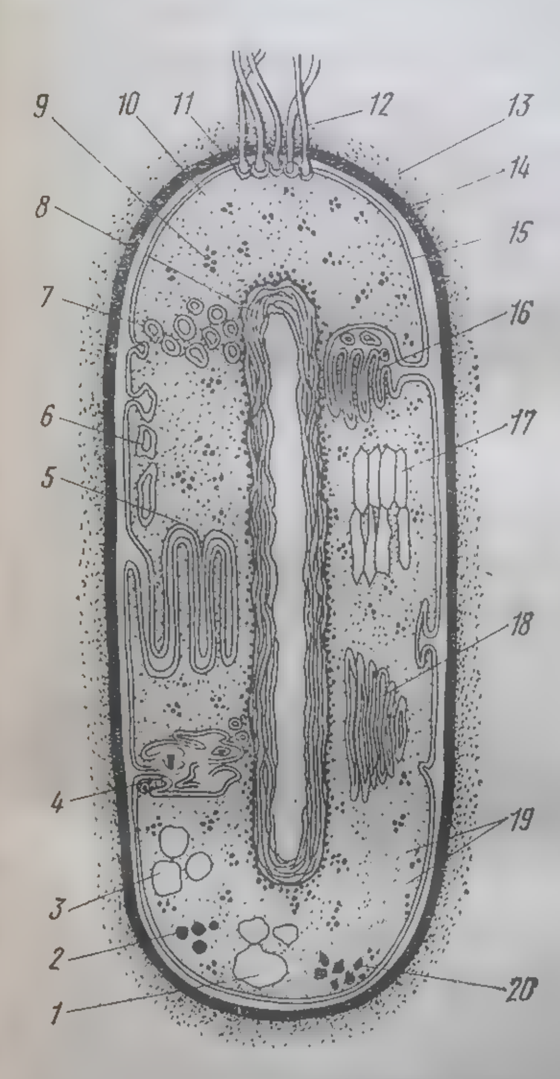


Рис. 3. Схема строения бактериальной клетки:

1 — гранула поли-β-оксимасляной кислоты; *2* — жировые капельки; *3* — включения серы; *4* — трубчатые тилакоиды; *5* — пластинчатые тилакоиды; *6* — пузырьки; *7* — хроматофоры; *8* — ядерное вещество (нуклеоид); *9* — рибосомы; *10* — цитоплазма; *11* — базальное тельце; *12* — жгутики; *13* — капсула; *14* — клеточная стенка; *15* — цитоплазматическая мембрана; *16* — мезосома; *17* — газовые вакуоли; *18* — ламеллярные структуры; *19* — гранулы полисахарида; *20* — гранулы полифосфата.

Клеточная стенка **г р а м о т р и ц а т е л ь н ы х б а к т е р и й** (рис. 4, *б*) устроена сложнее. Наружный слой представляет собой трехслойную складчатую структуру, состоящую из липополисахаридов и белков. На липиды в клеточной стенке приходится около 20% от ее массы. Толщина этого слоя примерно 9 нм.

У некоторых грамотрицательных бактерий следом за слоем, содержащим липиды, расположен слой, включающий моно-, амино- и липо-

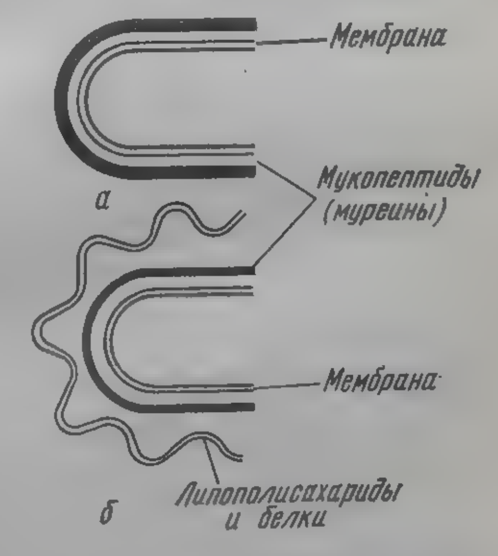


Рис. 4. Схема строения клеточных стенок грамположительных (*а*) и грамотрицательных (*б*) бактерий.

сахариды, у других микроорганизмов они входят в промежуточный слой, где гранулярные белки скреплены фибриллами мукопептида. Толщина этого слоя 5—12 нм. За этим слоем располагается муреиновый слой (3—6 нм), аналогичный внешнему слою у грамположительных бактерий. Клеточная стенка проницаема, через нее внутрь клетки транспортируются питательные вещества и выводятся продукты обмена. В клеточной стенке есть поры размером до 6 нм. Кроме того, клеточная стенка имеет отверстия выхода фимбрий, структурных тяжей и жгутиков. Клеточная стенка защищает клетку от внешних воздействий, поддерживает устойчивость определенной формы, способствует формированию капсулы.

Цитоплазматическая мембрана непосредственно прилегает к клеточной стенке. Но у некоторых бактерий между ними есть пространство, которое можно с некоторым допущением назвать периплазматическим. Здесь, по-видимому, сосредоточиваются гидролитические ферменты и вещества, транспортируемые внутрь клетки и за ее пределы. Цитоплазматическая мембрана бактерий представляет собой липопротеидную трехслойную мембрану (липидный слой покрыт с двух сторон белковым слоем). Толщина мембраны около 7,5 нм. Она является главным осмотическим барьером клетки, ею контролируются поступление и выброс веществ, водный и солевой обмены. Цитоплазматическая мембрана имеет многочисленные выпячивания (инвагинации). Внутри них находятся пузырьки и канальца, организованные в трубчатые и пластинчатые т и л а к о и д ы, бухтоообразные и спиралевидно закрученные тельца — м е з о с о м ы. Предполагают, что одни из них выполняют функции митохондрий, другие — эндоплазматического ретикулума, третьи — аппарата Гольджи и т. д. Но это пока недостаточно четко подтверждено экспериментально. Очевидно только, что в цитоплазматической мембране происходят важнейшие биохимические превращения с участием различных ферментов, осуществляется синтез некоторых компонентов клеточной стенки и капсулы. С мембраной частично связаны рибосомы клетки. Цитоплазматическая мембрана составляет около 20% сухой массы клетки.

Цитоплазма является внутренним содержимым клетки, где находятся все жизненно важные структуры и ор-

ганоиды, ее жидкой бесструктурной субстанцией с очень сложной, тонкой, слоисто-гранулярной структурой, состоящей из нерастворимой и растворимой частей. При высокой разрешающей силе электронного микроскопа в цитоплазме можно заметить тонкие нитевидные структуры различной длины и гранулы, которые, возможно, являются молекулами нуклеиновых кислот, ферментов, белков. В растворимой части цитоплазмы (в цитоплазме содержится до 70—80% всей воды клетки) обнаружены пигменты, сахара, аминокислоты и др. В цитоплазме бактерий находятся свободные рибосомы, местами имеющие высокую плотность упаковки, мембранные системы, на которых закреплены рибосомы и полисомы. В центральной части цитоплазмы находится ядерное вещество.

В цитоплазме могут присутствовать гранулы **запасных веществ:** крахмала, гликогена, гранулеза, капли жира, гранулы полифосфатов, включения серы и т. д.

Внутри клетки наблюдается высокое осмотическое давление: до 3 МПа у грамположительных бактерий и до 0,8 МПа — у грамотрицательных.

Ядерное вещество представляет собой нуклеоид. В отличие от эукариотической клетки ДНК бактериальной клетки не связана с гистонами и не отделена от цитоплазмы ядерной мембраной. Фибриллы бактериальной ДНК достаточно правильно ориентированы, поэтому ядерное вещество можно представить как образование, расположенное вдоль бóльшего габарита клетки и имеющее толщину около 3—4 нм, но конфигурация нуклеоида очень изменчива. ДНК — обособленный элемент, никогда не смешивающийся с цитоплазмой, в старых клетках ДНК упакована более компактно. Предполагают, что весь генóм бактериальной клетки представлен одной гигантской замкнутой молекулой ДНК с молекулярной массой $7 \cdot 10^9$. Ее вполне можно расценивать как бактериальную хромосому. Но все же следует помнить, что ДНК бактерий упакованы менее плотно, чем в ядре эукариотической клетки, в ядерном веществе отсутствует мембрана, не найдены ядрышко и набор хромосом, ДНК не связана с основными белками — гистонами. Все это свидетельствует об эволюционно более примитивной форме организации ядерного вещества у прокариотов. Многие бактерии имеют капсулу или дополнительные внешние структуры: жгутики, фимбрии, структурные тяжи.

Капсула не является обязательной частью бактериальной клетки. Она выполняет защитную функцию, предохраняя бактерии от механических повреждений, высыхания, служит препятствием для проникновения фага, создает дополнительный осмотический барьер. Капсула может покрывать клетку толстым слоем или тонкой пленкой, заметной только под электронным микроскопом. Консистенция капсулы слизистая, состоит она преимущественно из полисахаридов, гликопротеинов, реже из полипептидов и клетчатки.

Жгутики, располагающиеся на поверхности ряда бактерий, являются органом их передвижения. У подвижных бактерий обнаружен дополнительный органоид мембранной природы (аналог блефоропластов), к которому жгутик крепится базальной пластинкой. Толщина жгутика 10—20 нм, длина его может быть очень разной. Жгутики состоят из молекул белка — флагеллина, относящегося к сократительным белкам. По своей структуре жгутики бывают двух типов. Первый тип жгутиков характеризуется спиральной укладкой глобулярных белковых молекул, образующих от 3 до 10 параллельных рядов. У жгутиков второго типа с фибриллярной структурой белка фибриллы тянутся по всей длине органоида.

Фимбрии и пили — это тончайшие ворсинки, которые покрывают сверху всю поверхность бактерий. Эти структуры свойственны многим видам бактерий. Ворсинки выполняют прикрепительные функции, удерживая бактерии на различных частицах, они способствуют скреплению клеток между собой, выполняют роль защитного фактора, могут служить каналом для передачи наследственной информации (пили имеют канал длиной до 3—4 нм).

§ 4. ПУТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Жизненные циклы микроорганизмов во многом зависят не только от специфики их организации, но и от того, в какую внешнюю среду они попадают. В зависимости от среды обитания ослабляются или усиливаются те или другие ферментные системы организма, меняются ход и направленность сложнейших биохимических превращений в клетке.

Преобразование различных соединений среды обитания в вещества «тела» микроорганизма осуществляется

в результате огромного количества реакций, протекающих со строго запрограммированной последовательностью при участии всех органоидов и структур микробной клетки, а также мультиэнзимных систем, которые являются движущей силой всех процессов, имеющих место в живой клетке, т. е. в результате ее метаболизма.

Метаболизмом, или обменом веществ, называется вся сумма целенаправленных реакций, протекающих под действием ферментных систем клетки, которые регулируются различными внешними и внутренними факторами, и обеспечивающих обмен веществом и энергией между средой обитания и самой клеткой.

Результат жизнедеятельности микроорганизмов проявляется в увеличении размеров клетки, ее делении или почковании, что приводит к увеличению количества особей и возрастанию массы микроорганизмов в питательной среде.

Несмотря на огромные физиологические и морфологические различия между отдельными классами, родами и видами микроорганизмов, обмен веществ в клетке идет тремя основными (центральными) метаболическими путями.

1. Из внешней среды в клетку поступает энергия либо в виде химической энергии органических веществ, либо в виде энергии солнечного света.

2. Из веществ среды, перенесенных в клетку, собираются «строительные блоки», из которых должны формироваться биополимеры клетки и синтезироваться макромолекулы белков, нуклеиновых кислот, углеводов, жиров и других клеточных компонентов.

3. В клетке происходят постоянный синтез и разрушение биомолекул, выполняющих различные специфические функции.

Принципиальные основы центральных метаболических путей проследить и понять сравнительно легко, хотя каждый из этих путей представляет собой множество различных простых и сложных реакций, часть из которых пока еще до конца не расшифрована.

Обмен веществ у микроорганизмов можно рассматривать как сумму двух явлений (рис. 5): к а т а б о л и з м а, представляющего собой ферментное расщепление крупных органических молекул с выделением свободной энергии, которая запасается в виде макроэргических связей

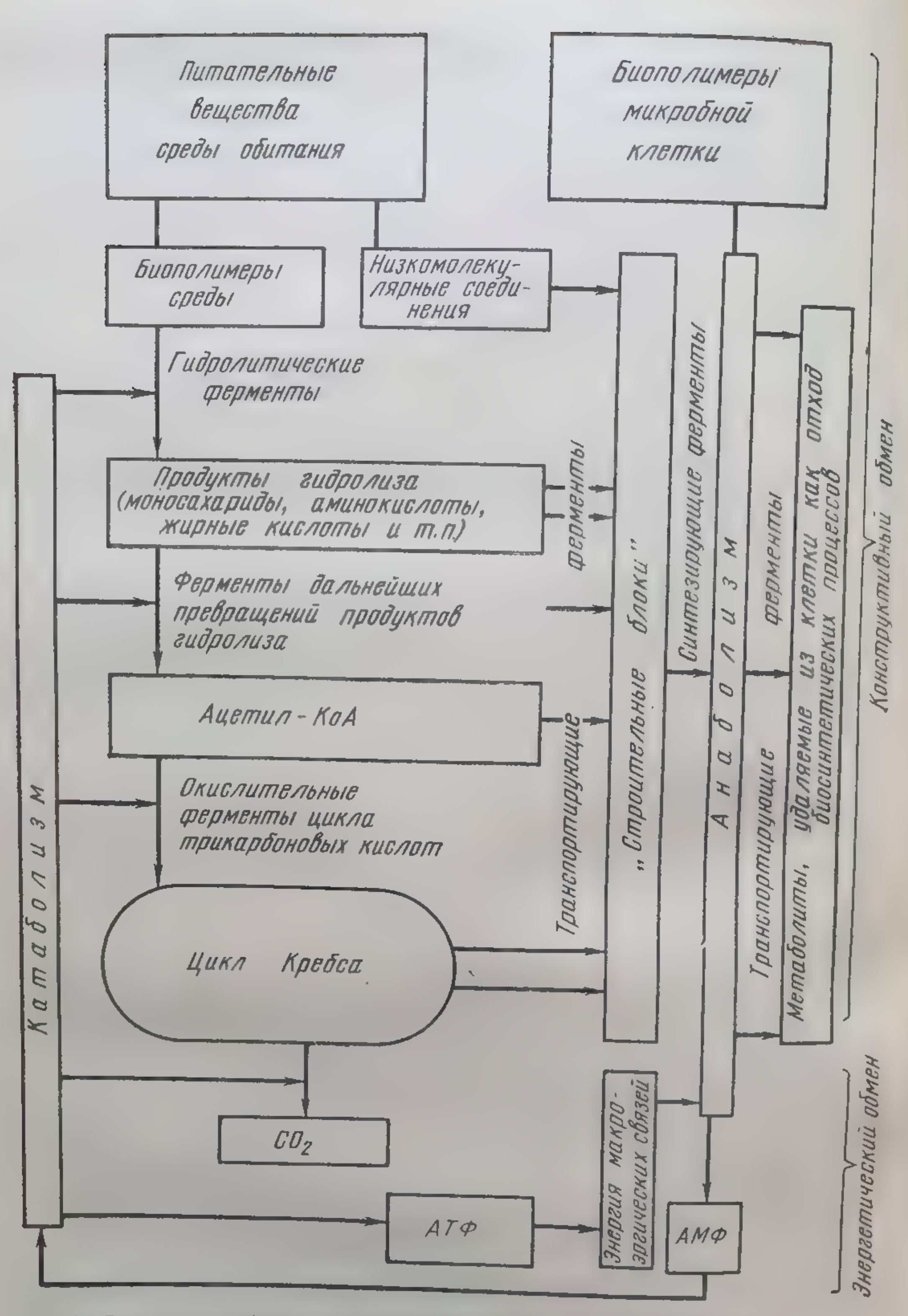


Рис. 5. Схема катаболизма и анаболизма микробной клетки.

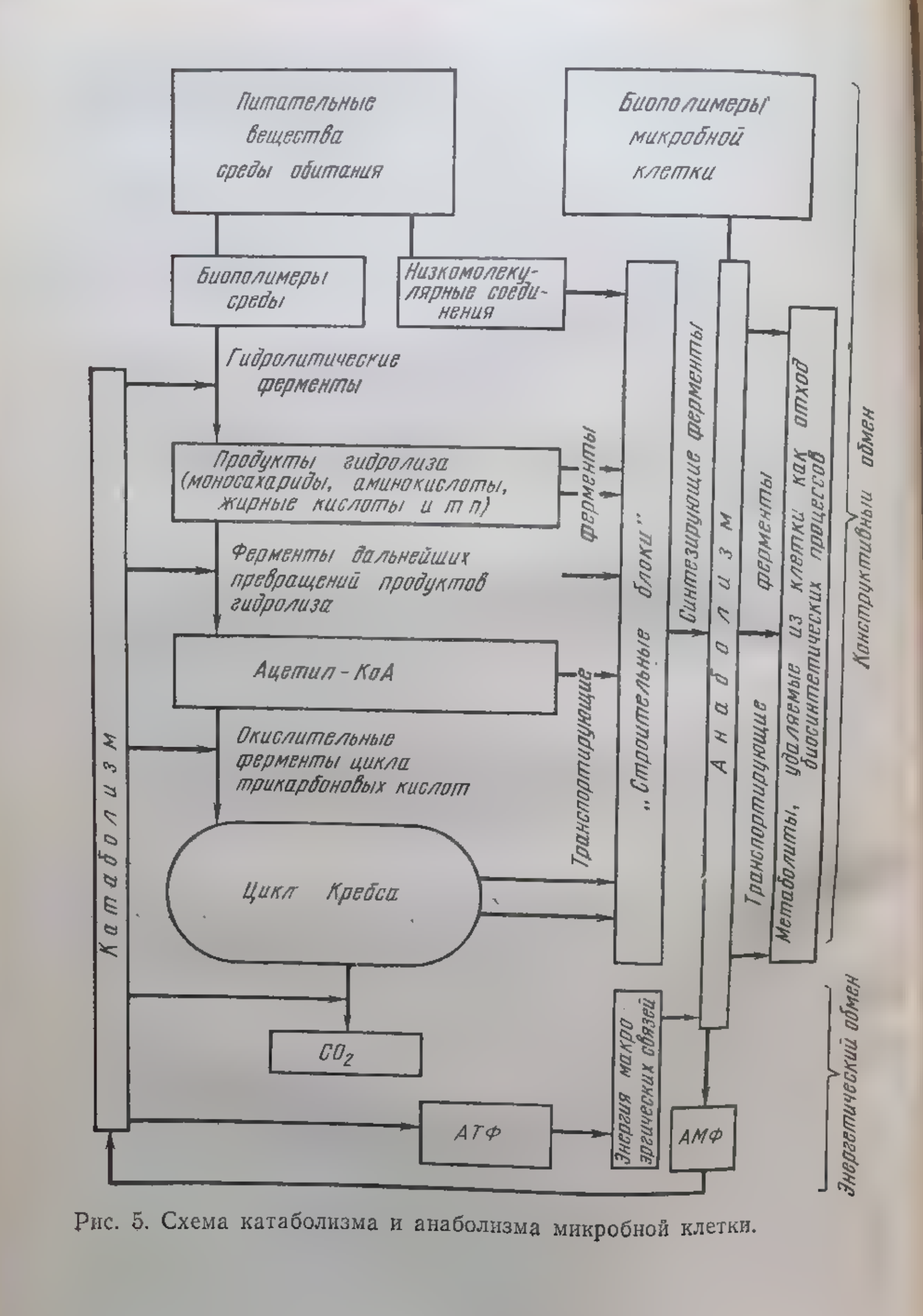


Рис. 5. Схема катаболизма и анаболизма микробной клетки.

в АТФ, и **анаболизма**, связанного с построением новых биополимеров клетки из простых соединений и протекающего с поглощением энергии макроэргических связей АТФ. В результате этих двух параллельно текущих процессов строится «тело» клетки, накапливаются необходимые клеткам запасные вещества, а также промежуточные продукты обмена веществ, которые частично остаются в клетке, а частично удаляются из нее как неиспользуемый отход метаболизма.

Таким образом, обмен веществ слагается, с одной стороны, из реакций, которые дают клетке «строительные блоки», образуют предшественники целевого продукта и сам продукт, с другой стороны, из энергетических изменений, которые обеспечивают все превращения в клетке, т. е. в клетке протекают **конструктивный** и **энергетический** обмены.

Катаболизм и анаболизм — это два самостоятельных пути в обмене веществ, хотя отдельные их участки могут быть общими. Такие общие участки, свойственные катаболизму и анаболизму, называют **амфиболическими**.

В катаболических и анаболических превращениях одна реакция следует за другой в строжайшей последовательности, так как продукты реакции предыдущей стадии процесса, как правило, являются субстратом для последующей. Такая четкая преемственность возможна благодаря высокой специфичности ферментов, участвующих в обмене веществ.

Ферменты обычно локализуются на определенных органоидах клетки и в растворимой фракции цитоплазмы. Есть мнение, что комплекс ферментов, осуществляющий определенный цикл последовательно текущих реакций, локализуется в структуре органоида таким образом и на таком расстоянии, чтобы обеспечить этот процесс с минимальными затратами энергии на перемещение промежуточных продуктов от фермента к ферменту. Поэтому реакция строго координируется в клетке по времени и в пространстве. Прекрасный пример тому — биосинтез белка на рибосомах.

В осуществлении ферментативных превращений большая роль принадлежит рибосомам, митохондриальным мембранам, цитоплазме и другим структурам клетки.

Скорость течения реакций и в целом обмен веществ клетки зависят от состава питательной среды, условий культивирования микроорганизмов и, главное, от потребности клетки в каждый данный момент в энергии (АТФ)

и «строительных блоках». Клетка очень экономно высвобождает энергию и нарабатывает «строительных блоков» ровно столько, сколько необходимо ей в настоящий момент. Этот принцип лежит в основе регуляции и контроля всех стадий метаболических путей в клетке.

Регуляция метаболизма в микробной клетке имеет сложную взаимозависимую систему, которая «включает» и «выключает» определенные ферменты с помощью самых различных факторов: pH реакционной среды, концентрации субстратов, некоторых промежуточных и конечных метаболитов, кофермента, металлов и т. д. Изучение путей регуляции определенных продуктов обмена веществ в клетке открывает неограниченные возможности для определения оптимальных условий биосинтеза микроорганизмом требуемого целевого соединения в промышленном производстве различных продуктов микробного синтеза.

Интенсивный обмен веществ между клеткой и средой обеспечивается большой поверхностью «тела» микроорганизма, через которую происходит поступление питательных веществ и выделение в окружающую среду продуктов жизнедеятельности клетки. В процессе роста и развития микроорганизмов заметно изменяется состав среды обитания, часть соединений непосредственно или после предварительного гидролиза ферментами клетки транспортируется внутрь микроорганизма, претерпевая сложные биохимические превращения в клеточное вещество микроба, а частично вновь поступает в среду в виде нереализуемых клеткой продуктов обмена.

§ 5. ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ПРИНЦИПЫ ИХ СОСТАВЛЕНИЯ

Потребность микроорганизма в тех или иных соединениях определяется физиологическими особенностями данного вида микроба, но во всех случаях среда должна быть водным раствором этих веществ и обеспечивать в определенном количестве приток их в клетку.

В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки. Однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, удаленных клеткой во внешнюю

среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах. Но все же первоначальную ориентировку в выборе оптимального состава питательной среды, исходя из состава клеточного вещества микроба, сделать можно. Усредненный элементарный состав биомассы некоторых групп микроорганизмов приведен в табл. 3.

Таблица 3

Химический состав микробной клетки	Состав биомассы, % на абсолютно сухое вещество		
	бактерий	дрожжей	грибов (мицелия со спорами)
Углерод	50,4	49,8	47,9
Азот	12,3	12,4	5,2
Кислород	30,5	31,1	40,2
Водород	6,8	6,7	6,7
P_2O_5	4,95	3,54	4,85
K_2O	2,41	2,34	2,81
SO_3	0,29	0,04	0,11
Na_2O	0,07	—	1,12
MgO	0,82	0,42	0,38
CaO	0,89	0,38	0,19
Fe_2O_3	0,08	0,03	0,16
SiO_2	0,03	0,09	0,04

Кроме элементов, указанных в табл. 3 (они являются важнейшими), в состав клеток всегда входят микроэлементы: бор, молибден, марганец, цинк, медь, бром, йод, кобальт и др., необходимые микроорганизмам для образования различных ферментов и витаминов. Чаще всего микроэлементы вносятся в среду вместе с водопроводной водой. Соотношение отдельных химических элементов в среде может заметно колебаться в зависимости от вида микроорганизмов и условий их роста.

Необходимо помнить, что все элементы, входящие в состав клеток микроорганизмов, должны присутствовать в питательной среде. Отсутствие даже одного из них приведет к замедлению роста или полному его прекращению.

Среди элементов наибольшее биогенное (жизненно важное) значение имеет углерод. Он входит в состав

почти всех органических соединений, образующихся в микробной клетке. Углерод вступает во взаимодействие с кислородом, водородом, азотом и серой, образует соединения из длинных цепочек углеродных атомов, связанных между собой последовательно или с участием некоторых других элементов, дающих циклические соединения. Известно, что такие вещества с углеродной цепочкой составляют основу жизненно важных соединений клетки: аминокислот, белков, углеводов, нуклеиновых кислот, жиров и т. д.

Вторым не менее важным биогенным элементом является азот. Он входит в состав аминокислот, белковых веществ, нуклеиновых кислот, которые самым активным образом участвуют в построении тела клетки, в процессах роста и размножения микроорганизма. Азотсодержащие соединения обладают высокой реакционной способностью.

Важны для питания микроорганизма и остальные элементы: фосфор, сера, кислород, железо, калий и др.

Микроорганизм использует питательные вещества среды не только на построение клеточного вещества, но и на обеспечение энергией всех биохимических превращений в клетке.

Микроорганизмы очень чувствительны к составу питательных сред. Одни соединения ими интенсивно потребляются, другие остаются нетронутыми или потребляются во вторую очередь. Состав среды меняется, и эти изменения в свою очередь оказывают влияние на биосинтетическую способность данного микроорганизма.

В то же время микроорганизмы весьма неприхотливы, они сравнительно легко адаптируются (приспосабливаются) к условиям обитания. Например, дрожжи прекрасно растут на глюкозе, сахарозе, мальтозе, но они могут быть адаптированы к выращиванию на пентозах, парафинах нефти, этиловом и метиловом спиртах и т. д.

Часто субстратом для жизнедеятельности микроорганизма служат такие соединения, которые они не в состоянии использовать без предварительной подготовки (например, целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, пектин, пентозаны и т. д.). В этом случае при подготовке питательной среды следует предусмотреть предварительный ферментативный либо химический способ разруше-

ния биополимера, с тем чтобы углерод в среде был в усвояемой форме.

Таким образом, для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов питательная среда должна содержать водный раствор или суспензию усвояемых форм углерода, азота и других необходимых элементов в виде питательных солей. Среда должна иметь определенное значение pH. Как правило, микроэлементы поступают в среду с водой, но при необходимости (при недостатке их в воде) они могут быть добавлены в нее.

Некоторым микроорганизмам для нормальной жизнедеятельности необходимо наличие в составе питательной среды так называемых дополнительных факторов роста, главным образом витаминов. В качестве факторов роста применяют автолизаты и гидролизаты дрожжей и других микроорганизмов, кукурузный экстракт, отвары растительных отходов и т. д.

Источники углерода. Подавляющее большинство продуцентов белковых веществ, аминокислот и липидов в качестве источника углерода ассимилируют органические вещества, исключением являются синезеленые водоросли, которые используют углерод углекислого газа. Независимо от используемого источника углерода микроорганизмы строят свои биополимеры в соответствии с составом, который предусмотрен их видовыми и физиологическими особенностями, генным аппаратом.

Непосредственным источником углерода могут быть различные углеводы несложного строения: гексозы, пентозы, низкомолекулярные олигосахариды. Полисахариды (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, крахмал), слизевые и гуммивещества, маннаны, пентозаны и т. д. могут быть источниками углерода либо после превращения их в усвояемые микроорганизмами моно-и низкомолекулярные олигосахариды, либо микроорганизм должен иметь набор ферментов, гидролизующих эти вещества. В качестве источника углерода микроорганизмы могут использовать органические кислоты, спирты, жирные кислоты, легкие и тяжелые углеводороды, аминокислоты и другие углеродсодержащие соединения.

Большое разнообразие усвояемых форм кислорода предопределяет различные пути ассимиляции и превращения этих соединений в «строительные блоки» клетки. Наиболее универсальными «строительными» блока-

ми» являются в клетке ацетальдегид, ацетат, ацетил-КоА, пировиноградная кислота. И чем короче и проще путь получения этих соединений из используемого сырья, тем выше его ценность как источника углерода.

Выбор источника углерода в технологии белковых веществ, липидов и аминокислот имеет очень большое значение. Он не только определяет пути обмена веществ данного микроорганизма, но часто предопределяет состав остальных компонентов среды и даже технологию и аппаратурное оформление производства целевого продукта, особенно если предполагается использование труднодоступного для микроорганизма субстрата, нуждающегося в предварительной подработке.

Источники азота. Известные продуценты белков, аминокислот и жиров не могут усваивать газообразный азот атмосферы. Необходимо, чтобы азот находился в среде в связанном химически активном состоянии, а не в виде инертного газа.

В составе питательной среды азот может содержаться в форме неорганических солей или кислот, в виде органических соединений—аминокислот, мочевины и т. д. Потребность в тех или иных азотсодержащих соединениях определяется физиологическими возможностями микроорганизмов. Часть микроорганизмов способны синтезировать аминокислоты и другие азотсодержащие соединения на основе компонентов среды с использованием азота неорганических соединений, другие требуют введения в состав среды готовых форм аминокислот или других органических источников азота. На основе экспериментального изучения потребности микроорганизма в той или иной форме азота определяется необходимое содержание этих веществ в питательной среде[1].

Иногда продуценты биологически активных веществ нуждаются в отдельных аминокислотах, реже — во всех 20 протеиногенных.

Органические азотсодержащие соединения и аммонийный азот обычно легко усваиваются микроорганиз-

---

[1] Содержание азота в питательной среде должно быть сравнительно высоким, так как биомасса, например, дрожжей состоит приблизительно на 45—55% сухой массы из белка, в котором около 6% азота. Поэтому для выращивания дрожжей требуется до 100 мг азота на 1 л питательной среды.

мами, нитраты — медленнее, так как азот нитратов должен быть сначала восстановлен и только потом реализован клеткой в обмене веществ; нитриты практически не используются как источник азота в среде.

При выборе источника азота следует помнить, что при потреблении аниона или катиона, в которые входит азот, будет происходить подкисление или подщелачивание питательной среды, что обязательно сказывается на обмене веществ микроорганизма. Поддержание pH на определенном уровне и влияние этого параметра на жизнедеятельность микроорганизма изучаются и устанавливаются экспериментально.

Недостаток (даже небольшой) в среде азота приводит к «ожирению» клеток, т. е. повышению содержания в них липидов за счет уменьшения белковой и аминокислотной фракций. Поэтому изменение соотношения в питательной среде углерода и азота, а также замена восстановленных форм азота окисленными, более трудно усвояемыми микроорганизмами, могут привести к значительным нежелательным изменениям в составе биомассы микроорганизма. На производстве, особенно при получении полноценных, обогащенных белком кормовых дрожжей, постоянно следят за тем, чтобы в среде не было недостатка азота.

Источники фосфора. Фосфор вносится в среду в виде солей фосфорной кислоты с различными естественными субстратами — отварами растительных тканей, мукой, кукурузным экстрактом и т. д., реже с органическими соединениями (например, фитином).

Фосфор является очень важным элементом в питательной среде. Он входит в состав АТФ, АДФ, АМФ и обеспечивает нормальное течение энергетического обмена в клетке, а также главнейших биосинтетических процессов, таких, как синтез белков, нуклеиновых кислот, гликолиз, и других важнейших биохимических превращений. Содержание фосфора в биомассе и скорость роста культуры в значительной степени зависят от концентрации фосфора в среде. При недостатке фосфора в среде, особенно в начальной фазе роста микроорганизмов, наблюдаются пониженный уровень накопления биомассы, незначительный прирост липидов, но одновременно с этим клетки обедняются белком и витамином B_2, резко снижается интенсивность дыхания и повышается бродильная способность дрожжей, в несколько раз снижает-

ся содержание фосфора во всех клеточных фракциях микроорганизма.

Источники витаминов и микроэлементов. Без витаминов, ионов металлов невозможно представить обмен веществ микробной клетки. Но потребность у микроорганизмов в этих соединениях различна. По этому признаку все микроорганизмы делятся на два типа: ауксоавтотрофы (не требующие введения в среду витаминов и синтезирующие их из «строительных блоков» самостоятельно) и ауксогетеротрофы (неспособные синтезировать ряд витаминов и требующие введения их в состав среды).

Если продуцентом является ауксоавтотрофный микроорганизм, введение в состав среды витаминов необязательно. Если же продуцент — ауксогетеротроф, то введение даже небольших количеств витаминов заметно ускоряет его рост и развитие. К сожалению, многие продуценты являются ауксогетеротрофными организмами. Для дрожжей, которые используются как продуценты белковых веществ и липидов, необходим водорастворимый комплекс витаминов группы В, в который входят тиамин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота, пиридоксин, инозит и биотин.

Биотин принимает участие в превращениях аминокислот, входит в активный центр ряда ферментов, катализирующих процесс карбоксилирования и декарбоксилирования жирных кислот. Инозит, соединяясь с шестью молекулами фосфорной кислоты, образует инозитфосфорную кислоту, способствующую росту дрожжей. Пантотеновая кислота входит в состав КоА, при участии которого происходят важнейшие превращения в клетке. Тиамин входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы, который расщепляет образующуюся при диссимиляции углеводов пировиноградную кислоту. Пиридоксин входит в состав ферментов, катализирующих превращение аминокислот, участвуя в реакциях переаминирования. Никотиновая кислота входит в состав таких окислительно-восстановительных ферментов, как дегидрогеназы. Рибофлавин, легко соединяясь с фосфорной кислотой, входит в состав флавиномононуклеотида, являющегося активной группой окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в переносе водорода. Парааминобензойная и фолиевая кислоты в восстановленной форме являются необходимой составной частью ряда ферментов, катализирующих обмен соединений, содержащих один углеродный атом (формальдегид, муравьиная кислота). Эти соединения являются исходным материалом для биосинтеза некоторых пиридиновых оснований и аминокислот (серина, гистидина и метионина).

Многие исследователи проводили работу по определению потребности дрожжей в витаминах, особенно для

рода Candida, имеющего большое промышленное значение. Было выяснено, что наибольший недостаток обнаруживается по биотину. При обследовании 33 видов дрожжей рода Candida только 6 не нуждались в биотине, тиамин был необходим семи видам, потребность же в остальных витаминах проявлялась только у 2—3 видов дрожжей. Ряд видов дрожжей совсем не требовал введения в среду витаминов, например C. utilis, C. scottii, C. pelliculosa, C. tropicalis var lambica и некоторые другие.

Обычно потребность микроорганизмов в витаминах устанавливается экспериментально, конкретно для каждого штамма. Как правило, недостатка в витаминах в средах нет, так как они вводятся вместе с растительными субстратами, которые являются одновременно основными источниками углерода в среде. В различных видах растительного сырья, используемого в производстве белковых веществ, аминокислот и липидов, содержатся следующие количества витаминов (в мг на 100 г):

Биотин	0,0034—0,0061
Пантотеновая кислота	0,06—0,22
Инозит	89—120
Тиамин	0,18—0,28
Пиридоксин	0,29—0,46
Никотинамид	5,0—5,15

Этого количества витаминов вполне достаточно для большинства микроорганизмов и только в очень редких случаях приходится прибегать к введению автолизатов микробных биомасс, кукурузного экстракта и т. п.

Макро- и микроэлементы обязательно должны входить в состав питательных сред. Многие ионы металлов, являясь составной частью активного центра ферментов или участвуя в поддержании их пространственной структуры, обеспечивают обмен веществ микроорганизмов. Ферменты, содержащие металлы (металлоэнзимы), активируют процессы дыхания, окислительно-восстановительные реакции, синтез аминокислот, жирных кислот, сахаров, нуклеотидов, пиримидиновых оснований, регулируют образование сложнейших молекул белков, гликогена, нуклеиновых кислот, их трансформацию и распад.

Наибольшее влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывают ионы железа, меди, марганца, цинка,

бора, молибдена, кобальта и ряда других металлов. Микроорганизмы обычно нуждаются в микродозах этих элементов, о чем свидетельствует количественный состав золы продуцента. Если же эти вещества присутствуют в средах в бо́льших количествах, чем это необходимо для развития микроорганизма, то они оказывают на процесс ингибирующее действие, что объясняется законами конкурентного и неконкурентного торможения.

Например, для нормального роста дрожжей необходимо наличие в среде железа, цинка и меди в количествах соответственно 0,2, 0,1 и 0,2 миллионных долей. Повышение содержания меди в сбраживаемом растворе глюкозы до 0,5 миллионной доли резко снижало сбраживание сахара, а увеличение содержания меди в 10 раз по сравнению с оптимальным вызывало полное прекращение процесса брожения.

Добавленные к синтетическим средам белки и экстракты растительных тканей заметно ослабляют токсическое действие меди, по-видимому, за счет способности этих веществ образовывать с медью комплексные соединения. Исследование тормозящего действия 50 наиболее распространенных элементов на процесс размножения дрожжей в синтетической среде показало, что только 10 элементов (C, H, O, N, Mg, K, Na, Ca, S, P) не оказывают отрицательного влияния на рост и развитие микроорганизмов. Токсическое действие на жизнедеятельность многих микроорганизмов, в том числе дрожжей, оказывают галогены, формальдегид, фенол, толуол, бензол и ряд других веществ. Например, установлено, что для полного подавления роста дрожжей достаточно присутствия в естественной питательной среде одного из следующих элементов или соединений в миллионных долях:

Ртуть	40—50
Хлор	125—200
Формальдегид	225—250
Кадмий	350—500
Медь	400—500
Двуокись серы	1250—1500
Фенол	2000—2500

Таким образом, для обеспечения процесса выращивания микроорганизмов необходимо иметь в составе питательной среды в определенном количестве источники углерода, азота, фосфора, витаминов, макро- и микроэлементов. Среда должна иметь определенное значение pH.

Состав питательной среды для каждого продуцента устанавливается экспериментально.

Процесс подбора оптимальной питательной среды для выращивания микроорганизма и для проявления им наивысшей биосинтетической активности в направлении образования целевого продукта — дело очень трудоемкое, сложное, требующее глубоких знаний физиологии микроорганизма. Выбор среды может идти месяцы и даже годы в зависимости от сложности поставленной задачи и степени изученности данного микроорганизма.

Принципиально состав оптимальной питательной среды для каждого микроорганизма может быть определен двумя способами: методом многостадийного длительного эмпирического подбора и с использованием математических методов планирования эксперимента.

Первый способ самый распространенный, им до последнего времени пользовались все производственники и ученые, работающие в отраслях промышленности, использующих микроорганизмы. Обычно на основе изучения физиологических особенностей микроорганизма определялся качественный состав среды, а количество компонентов устанавливалось путем постановки серии опытов, где один компонент среды изменялся в определенных пределах, все остальные оставались на постоянном уровне. Этот метод надежный, но очень длительный.

Новым в биологических исследованиях является использование математических методов планирования экспериментов, которые позволяют значительно быстрее найти и научно обосновать оптимальный состав питательной среды. Но такой эффект от использования математических методов планирования экспериментов возможен только тогда, когда начинают работать с новым организмом или недостаточно изученным объектом.

Большинство используемых в микробиологии математических методов планирования экспериментов (ПФЭ2^n, ДФЭ$2^{n-n'}$, ротатабельное планирование и т. д.) имеет целью получение математической модели процесса. Обработка экспериментальных данных может быть выполнена либо вручную, либо на ЭВМ. Статистический анализ значимости коэффициентов полученного уравнения и его адекватности (соответствия) исследуемому процессу в изучаемом диапазоне изменения переменных процесса позволяет с достаточной уверенностью находить

оптимальный состав среды и оптимальные условия культивирования микроорганизма. Стационарная точка процесса, т. е. экстремум по критерию оптимальности, определяется по полученной математической модели процесса.

Метод латинских прямоугольников позволяет с малыми затратами труда и времени оптимизировать многофакторные процессы без получения общей математической модели, однако он пригоден только для тех процессов, в которых отсутствует влияние факторов друг на друга, т. е. отсутствуют эффекты межфакторных взаимодействий.

Математические модели процесса культивирования позволяют объективно и количественно через соответствующие коэффициенты оценить влияние каждого исследуемого фактора на процесс с учетом возможного взаимодействия их со всеми остальными факторами.

Глава 2. РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ И ФОРМАЛИЗАЦИЯ ЭТОГО ПРОЦЕССА

На оптимальной питательной среде при благоприятных значениях pH и температуры, при условии подачи требуемого количества воздуха в среду микроорганизмы быстро начинают расти и размножаться, обеспечивая накопление биомассы продуцента и биологически ценных метаболитов в культуральной жидкости.

Существуют два способа культивирования микроорганизмов в глубине жидкой среды: периодический и непрерывный. При периодическом способе культивирования питательная среда засевается исходной культурой продуцента, и далее в этой же емкости микроорганизмы при определенных условиях проходят через все стадии роста и развития популяции. Когда процесс культивирования заканчивается, емкость для выращивания освобождают и цикл возобновляется, начиная от засева стерильной питательной среды исходной культурой продуцента. При таком способе культивирования (его можно назвать «закрытой» системой, когда хотя бы один из компонентов не может поступать в нее или выводиться из нее) скорость роста биомассы всегда должна стремиться к нулю либо из-за недостатка питательных веществ, либо из-за накоп-

ления в среде токсических метаболитов. Поэтому при периодическом способе культивирования микроорганизма всегда имеет место некоторая неустойчивость в системе.

При непрерывном способе культивирования микроорганизм постоянно получает приток свежей питательной среды, а из аппарата непрерывно отбирается биомасса вместе с образуемыми метаболитами (такой способ культивирования можно назвать «открытой» системой). При непрерывном культивировании микроорганизмы не должны испытывать недостатка в питательном субстрате, так как скорость его притока сбалансирована со скоростью выхода биомассы, кроме того, культура не отравляется продуктами обмена веществ — в этом большое преимущество непрерывного способа культивирования по сравнению с периодическим, преимущество «открытой» системы перед «закрытой».

§ 1. ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

При периодическом способе глубинного культивирования популяция микроорганизмов проходит семь стадий (фаз) роста (рис. 6). Иногда кривую роста числа клеток N дают в логарифмической зависимости от времени τ: $\lg N = f(\tau)$.

I фаза чаще всего называется л а г - ф а з о й. В этот период культура как бы адаптируется (привыкает) к новой среде обитания. Активируются ферментные системы клетки, возрастает количество нуклеиновых кислот, клетка готовится к интенсивному синтезу белков и других соединений. Продолжительность этой фазы зависит от физиологических особенностей микроорганизма, состава посевной и производственной сред и условий культивирования. Чем эти различия меньше и чем больше посевная доза, тем короче I фаза роста.

II фаза называется ф а з о й у с к о р е н и я р о с т а, она характеризуется началом деления клеток, увеличением общей массы популяции и постоянным увеличением скорости роста культуры; обычно она непродолжительна.

III фаза — это фаза наиболее активного роста числа клеток, она называется э к с п о н е н ц и а л ь н о й (л о г а р и ф м и ч е с к о й) ф а з о й роста. В этот период от-

мечается максимальная скорость роста культуры, интервалы между появлением предыдущего и последующего поколений постоянны. Логарифм числа клеток линейно зависит от времени.

В результате интенсивного роста и размножения культуры из питательной среды с той же интенсивностью поглощаются питательные вещества. Среда начинает истощаться вследствие катаболических и анаболических процессов, осуществляемых клетками микроорганизмов, в ней скапливаются продукты жизнедеятельности микроорганизмов, которые могут оказывать угнетающее действие на растущий организм. Возникает и пространственная ограниченность, клетки мешают друг другу, уменьшаются поверхности их контакта со средой, ухудшаются поступление питательных веществ внутрь клетки и выброс продуктов метаболизма. Скорость роста понижается, число делений сокращается, наступает IV фаза роста, которую принято называть **фазой замедления, или уменьшения скорости роста.**

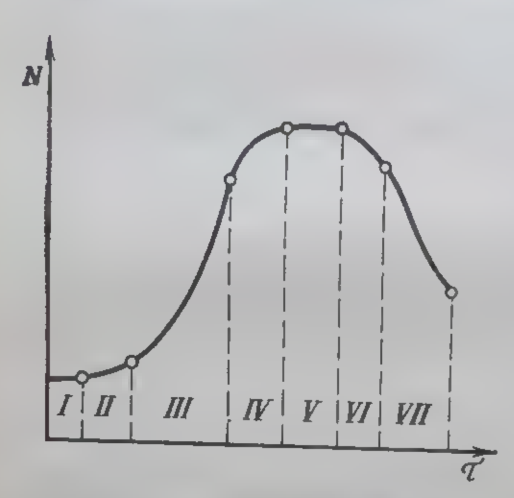


Рис. 6. Кривая роста микроорганизмов.

V фаза роста называется **стационарной.** Масса и количество всех живых клеток достигают своего максимума. Количество вновь образовавшихся клеток становится на этом этапе равным количеству клеток, отмерших и автолизовавшихся.

В какой-то момент это равновесие нарушается и количество отмерших клеток становится больше вновь образовавшихся, наступает VI фаза — **фаза ускорения отмирания.**

Завершается цикл роста и развития популяции в замкнутом объеме VII фазой, характеризующейся отмиранием и автолизом микроорганизмов, которая так и называется **фазой отмирания.** На этой стадии масса живых клеток значительно уменьшается, так как запасные вещества клетки исчерпываются.

Если ставится задача получения при периодическом процессе культивирования биомассы продуцента, рационально вести процесс до момента перехода роста культуры в стационарную фазу. Если же в производстве получают продукт метаболизма, то конец процесса определяется экстремумом в накоплении этого метаболита, он может совпадать с логарифмической фазой, стационарной или с фазой отмирания.

Периодический способ выращивания микроорганизмов — продуцентов белковых веществ — используется только для получения на некоторых этапах посевного материала и при микробиологическом производстве аминокислот.

При производстве же белковых веществ и липидов повсеместно применяется непрерывный способ культивирования микроорганизмов.

При непрерывном способе выращивания культура поддерживается постоянно в какой-то фазе роста. Если цель производства — получение биомассы продуцента, процесс рационально вести в режиме логарифмической фазы, когда микроорганизм способен обеспечить максимальные скорости роста популяции.

Такой процесс можно осуществить в одном аппарате при условии постоянного притока сбалансированной по составу среды и оттока готовой культуры. После установления требуемого режима в начальный момент работы системы на протяжении всего времени последующей работы аппарата параметры процесса сохраняются постоянными.

Если же целью культивирования микроорганизмов является получение метаболита, выход которого в среду обитания или накопление его в биомассе продуцента не соответствует логарифмической фазе роста, применяется непрерывный способ выращивания в двух или нескольких последовательно соединенных аппаратах, что позволяет как бы расчленить процесс на несколько стадий.

В каждом аппарате параметры процесса будут постоянны, но они будут различаться с переходом от аппарата к аппарату. При этом способе непрерывного культивирования только в первый аппарат подается питательная среда и только из последнего отбирается готовый продукт.

§ 2. КИНЕТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Для характеристики эффективности процесса роста и развития микроорганизмов большое значение имеет скорость роста популяции. При наличии данных о скоростях роста микроорганизмов, использования ими субстрата, образования основных метаболитов создаются предпосылки для разработки основ научной организации производства и управления основной стадией в технологии продуктов микробного синтеза — стадией культивирования микроорганизмов.

Однозначно математически выразить процесс культивирования очень сложно, так как его течение определяется множеством взаимосвязанных факторов: возрастом, физиологическим состоянием исходной культуры, составом питательной среды, конструктивными особенностями аппарата, способом подачи воздуха, температурой, изменением pH среды и т. д. Поэтому при построении математической модели процесса культивирования не учитывают всю сумму разнообразных факторов, а выбирают один или несколько, определяющих процесс.

Одной из моделей, отражающих зависимость скорости образования и накопления микробной биомассы от концентрации субстрата S (одного из определяющих факторов), является уравнение Моно

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S}, \tag{1}$$

где μ — удельная скорость роста микроорганизмов, $ч^{-1}$;
μ_{max} — предел удельной скорости роста μ, определяемый экспериментально по мере увеличения S, $ч^{-1}$;
S — концентрация субстрата, кг/м³;
K_s — константа насыщения, при которой скорость накопления биомассы составляет половину максимальной, кг/м³.

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{d\tau}, \tag{2}$$

где x — концентрация биомассы, кг/м³;
τ — время, ч.

Если предположить, что $K_s = S$, то

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + S} = \frac{\mu_{max}}{2}.$$

Величина K_s очень мала [$K_s \approx (0,1 \div 0,01)$ кг/м³], следовательно, даже при этой концентрации удельная скорость роста лишь в 2 раза меньше максимальной.

При малых концентрациях S, когда можно принять $K_s+S=K_s$, удельная скорость пропорциональна концентрации (реакция первого порядка), при больших концентрациях S удельная скорость от концентрации не зависит (реакция нулевого порядка).

В соответствии с этим положением можно утверждать, что чем больше концентрация, тем ближе скорость роста к максимальной, однако при любых условиях $\mu<\mu_{max}$.

При практической реализации процесса непрерывного культивирования кривая скорости роста $\mu=f(S)$ носит экстремальный характер.

При описании кинетики роста микроорганизмов следует учитывать тормозящее действие продуктов, выделяющихся в процессе обмена:

$$\mu=\mu_{max}\frac{S}{K_s+S}\cdot\frac{K_p}{K_p+P}, \qquad (3)$$

где P — концентрация продуктов обмена в культуральной жидкости, кг/м³;

K_p — константа, равная концентрации продуктов обмена (в кг/м³), при которой происходит уменьшение удельной скорости роста вдвое, т. е. $K_p=P$:

$$\mu=\mu_{max}\frac{S}{K_s+S}\cdot\frac{P}{P+P}=\frac{1}{2}\mu_{max}\frac{S}{K_s+S}.$$

Иерусалимский с соавторами высказал мнение, что концентрация ингибиторов роста пропорциональна количеству переработанного субстрата или образовавшейся биомассы, т. е.

$$P=A(S_0-S),$$

где A — коэффициент пропорциональности, определяемый как отношение $\Delta P/\Delta S$;

S_0 — исходная концентрация субстрата;

S — текущая концентрация субстрата.

На практике определить P довольно сложно, поэтому вводится новая константа $K_{ps}=\dfrac{K_p}{A}$, тогда

$$\mu=\mu_{max}\frac{S}{K_s+S}\cdot\frac{K_{ps}}{K_{ps}+(S_0-S)}, \qquad (4)$$

где K_p, K_{ps} — константы, определяемые экспериментально и зависящие от вида и физиологических особенностей микроорганизма. K_{ps} соответствует удельному потреблению субстрата на единицу количества метаболитов, имевшему место в процессе при уменьшении скорости роста вдвое.

Концентрация биомассы микроорганизмов x может быть определена по следующему уравнению:

$$dx = -\frac{1}{\alpha} dS \text{ или } x \simeq \frac{S_0 - S}{\alpha}, \quad (5)$$

где α — коэффициент (трофический) пропорциональности, равный количеству субстрата, расходуемого на единицу вновь образующейся биомассы.

Учитывая, что $\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{d\tau}$, можно записать:

$$\frac{dx}{d\tau} = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{ps}}{K_{ps} + (S_0 - S)} \cdot \frac{S_0 - S}{\alpha}, \quad (6)$$

где

$$\frac{dx}{d\tau} = -\frac{1}{\alpha} \cdot \frac{dS}{d\tau}. \quad (7)$$

Тогда

$$-\frac{dS}{d\tau} = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{ps}}{K_{ps} + (S_0 - S)} (S_0 - S),$$

или

$$-\frac{dS}{d\tau} = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{1}{\frac{1}{S_0 - S} + \frac{1}{K_{ps}}}. \quad (8)$$

Необходимо учитывать, что скорость потребления субстрата зависит не только от скорости размножения, но и от уже имеющейся численности популяции, для поддержания жизнеспособного состояния которой дополнительно расходуется некоторое количество субстрата.

Из уравнения (7) можно получить $-\frac{dS}{d\tau} = \alpha \frac{dx}{d\tau}$.

С учетом расходования субстрата на поддержание популяции

$$-\frac{dS}{d\tau} = \alpha \frac{dx}{d\tau} + bx,$$

где b — коэффициент основного обмена, характеризующий потребление питательных веществ на поддержание единицы массы популяции в жизнеспособном стабильном состоянии.

Иерусалимским было введено понятие коэффициента физиологической активности q, который можно записать в виде следующей зависимости:

$$|q| = \frac{1}{x} \cdot \frac{dS}{d\tau}, \quad (9)$$

или иначе

$$|q| = \alpha\mu + b.$$

Одним из уравнений, используемых для расчета потребления сахара кормовыми дрожжами в аэробных условиях, является выражение, предложенное Андреевым:

$$S = S_0 - \frac{x_1}{y}\left(e^{\mu_{max} T} - 1\right), \qquad (10)$$

где S — концентрация сахара в бражке после одного оборота аппарата, кг/м³;
S_0 — начальная концентрация сахара в сусле, кг/м³;
x_1 — концентрация активных дрожжей, кг/м³;
y — экономический коэффициент [1];
μ_{max} — предел удельной скорости роста, ч$^{-1}$;
T — время одного оборота аппарата, ч.

Величины μ_{max} и x_1 неодинаковы для различных сред. Известно, что константа скорости увеличивается при наличии в среде биостимуляторов. Кроме того, значительное влияние на нее оказывает коэффициент разбавления среды D, который характеризуется отношением объема питательной среды, поступающей в аппарат в единицу времени, к полезному объему аппарата.

Принято, что время оборота аппарата T — величина, обратная коэффициенту разбавления среды D:

$$T = \frac{1}{D} \text{ или } D = \frac{1}{T}. \qquad (11)$$

---

[1] Под экономическим коэффициентом y понимают отношение величины прироста биомассы к количеству потребленного субстрата питательной среды:

$$y = \frac{dx}{|dS|}.$$

Если в этом уравнении dx и dS заменить их значениями из уравнений (2) и (9), то получим

$$y = \frac{\mu}{|q|} = \frac{1}{\alpha + \frac{b}{\mu}}.$$

Экономический коэффициент равен 0 при $\mu \to 0$ (для неразмножающихся культур).

Подставив в уравнение (11) значение T из уравнения (10), получим выражение для максимального коэффициента разбавления

$$D_{max} = \frac{\mu_{max}}{2,3 \lg \left(1 + \frac{\Delta x}{x_1}\right)}, \tag{12}$$

где Δx — прирост концентрации биомассы за один оборот аппарата, кг/м³.

При непрерывном способе культивирования уравнение материального баланса для n-го ферментатора будет иметь следующий вид:

$$V_p \frac{dx_n}{d\tau} = v_\tau x_{n-1} - v_\tau x_n + V_p \mu_n x_n, \tag{13}$$

где v_τ — скорость поступления питательной среды в ферментатор, м³/ч;

V_p — полезный объем реактора (ферментатора), м³.

Преобразуя уравнение (13), получим

$$\frac{dx_n}{d\tau} = D(x_{n-1} - x_n) + \mu_n x_n.$$

Для установившегося процесса $\frac{dx_n}{d\tau} = 0$. Тогда

$$x_n = \frac{Dx_{n-1}}{D - \mu_n}.$$

Для батареи, состоящей из N ферментаторов, можно записать:

$$x_N = \frac{Dx_{N-1}}{D - \mu_N} = \frac{D^2 x_{N-2}}{(D - \mu_N)(D - \mu_{N-1})} = \dots = \frac{D^{N-1} x_1}{\prod_{n=1}^{N} (D - \mu_n)}.$$

Если составляется баланс для единичного аппарата, то $N=1$. Тогда

$$x_1 = \frac{Dx_0}{D - \mu_1} \text{ или } x_1(D - \mu_1) = Dx_0.$$

Но при установившемся режиме концентрация биомассы x_0 равна нулю. Тогда $D - \mu_1 = 0$ и $D = \mu_1$.

В случае, когда коэффициент разбавления становится больше скорости роста микроорганизмов при данной

концентрации лимитирующего субстрата в среде, культура вымывается. Когда коэффициент разбавления меньше скорости роста микроорганизмов, в аппарате наблюдается увеличение концентрации клеток, и рост микроорганизмов затормаживается из-за недостатка питания и увеличения концентрации продуктов обмена в среде.

При увеличении концентрации питательных веществ увеличиваются концентрации микроорганизмов и метаболитов, но снижается активность клеток. При увеличении коэффициента разбавления активность клеток повышается.

Характеристикой активности культуры β является степень участия биомассы в процессе активного биосинтеза клеточного вещества, т. е. в процессе размножения. Активность культуры описывается уравнением

$$\beta = \frac{x_1}{x}, \qquad (14)$$

где x_1 — активная размножающаяся биомасса;
x — вся биомасса.

Чем больше делящихся или почкующихся клеток, тем активнее культура. В отмирающей культуре, когда она находится в VI—VII фазах роста, $\beta=0$. Если все клетки размножаются одинаково интенсивно, то $\beta=1$.

Концентрация микроорганизмов в аппарате определяется величиной прироста биомассы за счет потребляемого сахара и количеством возвращаемых или задерживаемых в аппарате микробных клеток.

Важной характеристикой непрерывного процесса культивирования микроорганизмов в хемостате является отношение общей концентрации микроорганизмов x к концентрации естественного прироста Δx, выражаемое величиной γ:

$$\gamma = \frac{x}{\Delta x}. \qquad (15)$$

При непрерывном процессе, осуществляемом в одном аппарате (гомогенно-проточная культура), при установившемся режиме работы $\gamma=1$, а среднее время пребывания микроорганизмов в аппарате τ равно времени пребывания в нем среды T. В случае задержки микроорганизмов в аппарате $\gamma>1$. В случае вымывания культуры $\gamma<1$.

Для определения максимального коэффициента разбавления D_{max} с учетом активности культуры в уравнение (12) вводятся величины β из уравнения (14) и γ из уравнения (15):

$$D_{max} = \frac{\mu_{max}}{2,3 \lg \left(\frac{1}{\beta\gamma} + 1\right)}.$$

Опыт культивирования самых разнообразных микроорганизмов говорит о том, что максимальное накопление биомассы определяется соответствующим запасом субстрата в питательной среде. Увеличение выхода биомассы наблюдается лишь до определенных пределов повышения концентрации питательных веществ в среде. Слишком высокая концентрация тормозит развитие микроорганизма.

Лимитирующими факторами для роста микроорганизмов могут быть недостаточное содержание в среде углеводов, азотистых веществ, ростовых и минеральных соединений, наличие посторонней микрофлоры, неблагоприятные условия культивирования, например: малая скорость растворения кислорода в среде, повышенные или пониженные температура и кислотность, большая вязкость, высокое осмотическое давление, недостаточная или чрезмерная интенсивность перемешивания и т. п.

Математическое выражение процесса культивирования должно отражать способ выращивания микроорганизма (непрерывный или периодический) и конструктивные особенности аппаратов для выращивания.

§ 3. КИНЕТИКА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА В ПЕРИОДИЧЕСКИ ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ

При проведении процесса выращивания микроорганизмов в периодически действующем аппарате уравнение (5), записанное в виде

$$x(\tau) = \frac{S_0 - S(\tau)}{\alpha}, \quad (16)$$

позволяет рассчитать время достижения заданной концентрации биомассы микроорганизмов.

Продуктивность культивирования микроорганизмов в периодически действующем аппарате для любого момента времени процесса определяется приращением концентрации биомассы в единицу времени (мгновенная продуктивность):

$$g = \frac{dx}{d\tau} = \mu x \tag{17}$$

и согласно уравнению (6) равна

$$g = \frac{\mu_{\max} S K_{ps} (S_0 - S)}{(K_s + S)(K_{ps} + S_0 - S)\alpha}. \tag{18}$$

При проведении процесса выращивания микроорганизмов в периодически действующем аппарате продуктивность культивирования изменяется с течением времени. Время достижения максимальной мгновенной продуктивности аппарата соответствует максимальному накоплению биомассы. Более полное представление об эффективности периодического процесса дает величина средней продуктивности периодически действующего аппарата, которая определяется по уравнению

$$g_{\text{ср}} = \frac{x - x_0}{\tau}, \tag{19}$$

где x_0 — начальная концентрация биомассы микроорганизмов в аппарате.

Значение текущей концентрации субстрата является функцией времени $[S = f(\tau)]$. Раскрыв эту зависимость, можно определить из уравнения (16) величину $x(\tau)$.

Для получения функциональной зависимости $S = f(\tau)$ интегрируем уравнение (8) по частям и в результате преобразований получаем выражение

$$\frac{S^n}{S_0 - S} e^{\omega S} = Ce^{-K\tau}, \tag{20}$$

где

$$n = \frac{K_s K_{ps} + K_s S_0}{K_{ps} S_0 + K_{ps} K_s}; \tag{21}$$

$$\omega = \frac{S_0}{K_{ps} S_0 + K_{ps} K_s}; \tag{22}$$

$$C = \frac{S_{\text{н}} \exp \dfrac{S_{\text{н}} S_0}{K_{ps} S_0 + K_{ps} K_s}}{S_0 - S_{\text{н}}} \tag{23}$$

(здесь S_0 — исходная концентрация субстрата; $S_{\text{н}}$ — концентрация субстрата, соответствующая началу роста биомассы).

$$K = \mu_{\max} \frac{S_0}{S_0 + K_s}. \tag{24}$$

Примем следующие обозначения:

$$F_1(S) = \frac{S^n}{S_0 - S} e^{\omega S}, \tag{25}$$

$$F_2(\tau) = Ce^{-K\tau}. \tag{26}$$

Тогда

$$F_1(S) = F_2(\tau). \tag{27}$$

Построение зависимости $S=f(\tau)$ производится на координатной плоскости (рис. 7), образованной четырьмя полуосями: τ, S, $F_1(S)$ и $F_2(\tau)$.

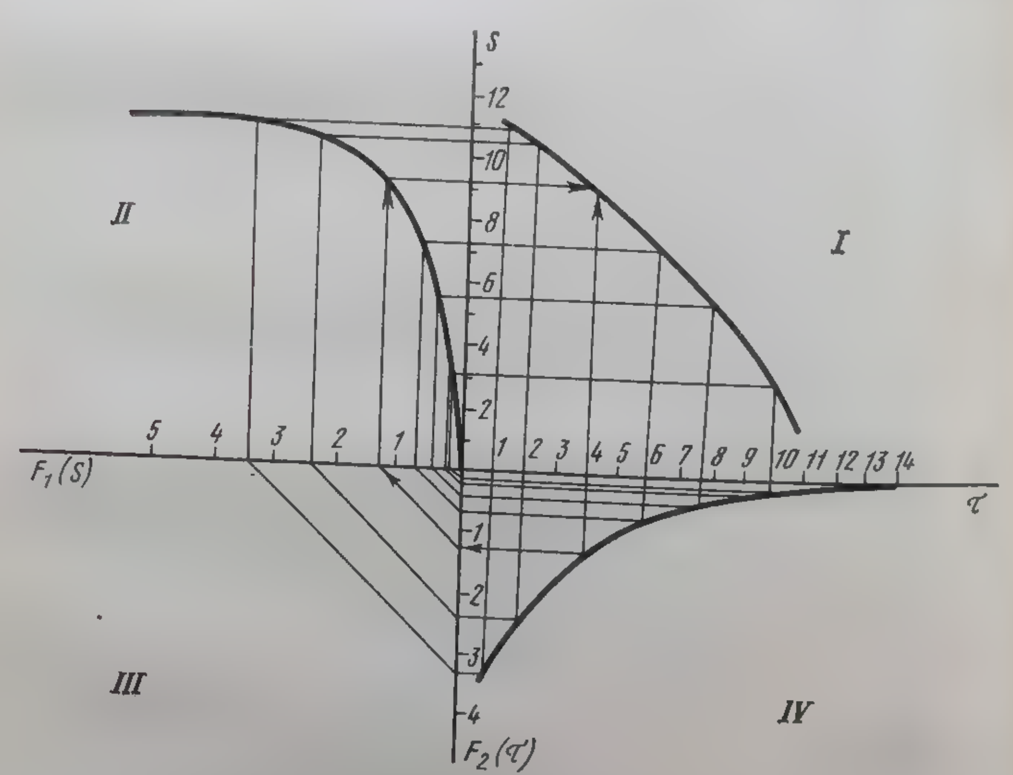


Рис. 7. Графическое определение зависимости $S=f(\tau)$.

Задаваясь значениями концентрации субстрата S, строим на основании уравнения (25) зависимость функции $F_1(S)$ от S во II квадранте. Затем, задаваясь значениями времени τ, рассчитываем по уравнению (26) соответствующие значения $F_2(\tau)$ и наносим их в IV квадрант. Учитывая равенство (27), переносим полученные

значения $F_2(\tau)$ на ось $F_1(S)$ и находим по графику $F_1(S)$ соответствующее значение концентрации субстрата.

Затем в *I* квадранте строим точки с координатами исходного значения времени τ и соответствующего ему значения концентрации субстрата S.

Получив зависимость $S=f(\tau)$, определяем накопление биомассы во времени по уравнению (16). Продуктивность культивирования для любого момента времени процесса (мгновенная продуктивность) рассчитывается по уравнению (18).

Пример. Определить основные технологические показатели периодически действующего аппарата и выбрать оптимальный режим работы аппарата.

Исходные данные: $\mu_{max}=0{,}342$ ч$^{-1}$; $K_{ps}=15{,}4$ кг/м^3; $K_s=1{,}52$ кг/м^3; $x_0=0{,}57$ кг сухой биомассы (СБ) на 1 м^3; $\alpha=1{,}22$; $S_0=11{,}7$ кг/м^3; $S_н=11{,}0$ кг/м^3. Рассчитываем константы уравнения (20) по формулам (21) — (24):

$$n=\frac{1{,}52\cdot 15{,}4+1{,}52\cdot 11{,}7}{15{,}4\cdot 11{,}7+15{,}4\cdot 1{,}52}=0{,}2023;$$

$$\omega=\frac{11{,}7}{15{,}4\cdot 11{,}7+15{,}4\cdot 1{,}52}=0{,}0575.$$

Константы C и K рассчитываем при $\tau=0$:

$$C=\frac{11^{0{,}2}\ e^{0{,}632}}{11{,}7-11{,}0}=4{,}36;$$

$$K=0{,}342\frac{11{,}7}{11{,}7+1{,}52}=0{,}3026.$$

Задаваясь значениями концентрации субстрата S от 1 до 12, рассчитываем по формуле (25) $F_1(S)$ и строим зависимость $F_1(S)$ от S во *II* квадранте координатной плоскости (см. рис. 7). Задаваясь значениями времени τ, рассчитываем по формуле (26) $F_2(\tau)$ и наносим полученные значения $F_2(\tau)$ от τ в *IV* квадрант.

Переносим полученные значения $F_2(\tau)$ на ось $F_1(S)$ и находим по графику $F_1(S)$ соответствующее значение концентрации субстрата. В *I* квадранте строим точки с координатами исходного значения времени τ и соответствующие ему величины S, т. е. зависимость $S=f(\tau)$.

Затем по выражению (16) определяем величину накопления биомассы микроорганизма во времени $x=f(\tau)$, а по выражениям (18) и (19) — соответственно мгновенную и среднюю продуктивности аппарата. Полученные данные приведены в табл. 4.

Максимальная средняя продуктивность аппарата в нашем примере достигнута за 11 ч культивирования, при приросте концентрации биомассы 8,44 кг СБ/м^3 и концентрации субстрата 1,4 кг/м^3.

Таблица 4

Данные для построения кривой $F_1(S)$		Данные для построения кривой $F_2(\tau)$		Данные для расчета мгновенной и средней продуктивности			
Концентрация субстрата S, кг/м³	$F_1(S)$	Время τ, ч	$F_2(\tau)$	Время τ, ч	Изменение концентрации субстрата (S_0-S), кг/м³	Мгновенная продуктивность g, кг/(м³·ч)	Средняя продуктивность $\bar{g}_{ср}$, кг/(м³·ч)
2	0,133	2	2,380	1	0,8	0,18	—
4	0,287	4	1,298	2	1,2	0,28	0,49
6	0,355	6	0,698	4	2,5	0,54	0,51
8	0,653	8	0,388	8	5,7	0,92	0,58
9	0,976	10	0,210	10	8,1	1,04	0,66
10	1,656	11	0,156	11	10,3	0,84	0,77
11	4,382	12	0,116	12	10,8	0,68	0,74

Анализ приведенных на рис. 8 зависимостей, полученных при несколько иных, чем в рассмотренном примере, исходных данных, показывает, что прекратить процесс культивирования в момент времени, соответствующий

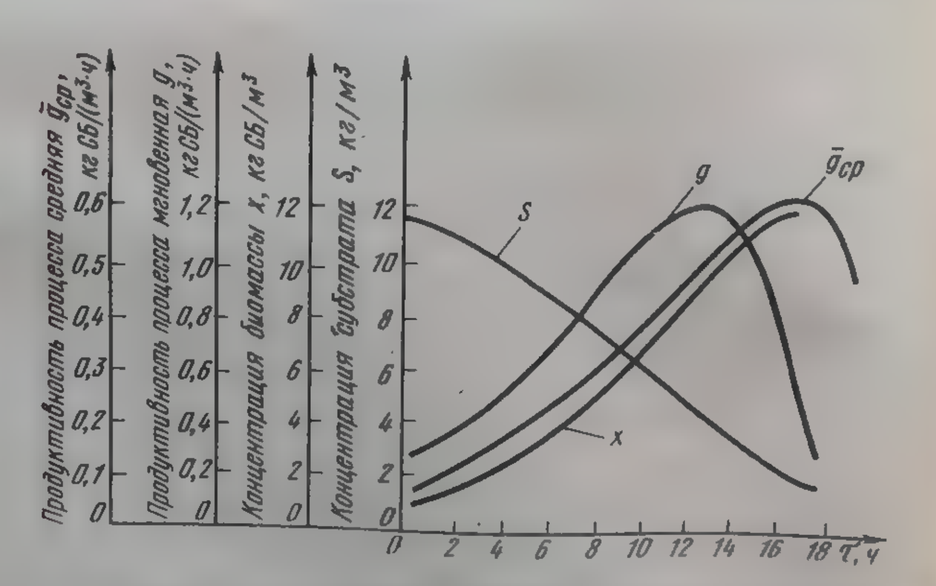


Рис. 8. Изменение концентрации субстрата, биомассы микроорганизмов, мгновенной и средней продуктивности с течением времени.

Таблица 4

Данные для построения кривой $F_1(S)$		Данные для построения кривой $F_2(\tau)$		Данные для расчета мгновенной и средней продуктивности			
Концентрация субстрата S, кг/м³	$F_1(S)$	Время τ, ч	$F_2(\tau)$	Время τ, ч	Изменение концентрации субстрата (S_0-S), кг/м³	Мгновенная продуктивность g, кг/(м³·ч)	Средняя продуктивность $g_{ср}$, кг/(м³·ч)
2	0,133	2	2,380	1	0,8	0,18	—
4	0,287	4	1,298	2	1,2	0,28	0,49
6	0,355	6	0,698	4	2,5	0,54	0,51
8	0,653	8	0,388	8	5,7	0,92	0,58
9	0,976	10	0,210	10	8,1	1,04	0,66
10	1,656	11	0,156	11	10,3	0,84	0,77
11	4,382	12	0,116	12	10,8	0,68	0,74

Анализ приведенных на рис. 8 зависимостей, полученных при несколько иных, чем в рассмотренном примере, исходных данных, показывает, что прекратить процесс культивирования в момент времени, соответствующий

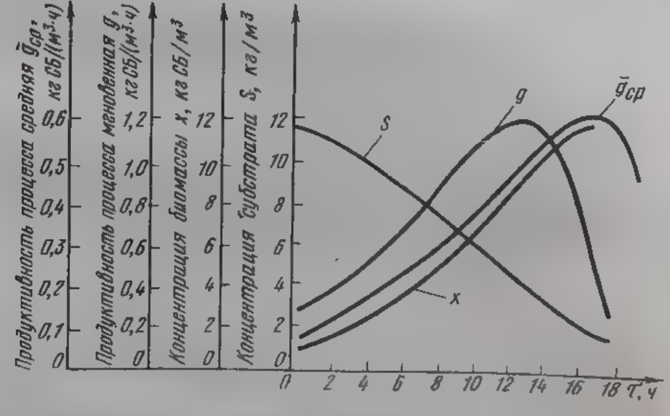


Рис. 8. Изменение концентрации субстрата, биомассы микроорганизмов, мгновенной и средней продуктивности с течением времени.

максимальной мгновенной продуктивности аппарата нельзя, так как к этому времени средняя продуктивность аппарата еще не достигает максимального значения. Процесс культивирования должен быть прекращен в момент времени, соответствующий максимальной средней продуктивности аппарата.

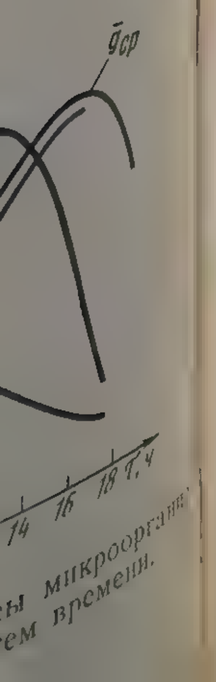
При выявлении максимальной средней продуктивности периодически действующего аппарата необходимо учитывать время прохождения лаг-фазы и время проведения вспомогательных операций (время загрузки и разгрузки аппарата), так как эти операции увеличивают период процесса, в результате чего снижается максимальная средняя продуктивность аппарата.

§ 4. КИНЕТИКА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА В НЕПРЕРЫВНО ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ ПОЛНОГО СМЕШЕНИЯ

При периодическом культивировании микроорганизмы проходят через ряд стадий, обмен веществ их меняется, меняются условия обитания, в то время как при непрерывном способе культивирования все параметры среды и характеристики физиологических функций микроорганизма являются величинами постоянными в данном сечении аппарата или даже во всем объеме аппарата. Продуктивность непрерывного процесса обычно выше, чем периодического, так как при непрерывном ведении процесса оказывается возможным стабилизировать во времени максимальную продуктивность.

Непрерывное культивирование может осуществляться в аппаратах идеального вытеснения и идеального перемешивания (полного смешения). Первые характеризуются тем, что микроорганизм движется в потоке по трубе, претерпевает соответствующие возрастные изменения и в результате своей жизнедеятельности вызывает изменения в составе и концентрации питательных веществ в среде. Вторые характерны тем, что свежая порция среды или биомассы практически мгновенно благодаря мощным и совершенным перемешивающим устройствам распределяется по всему полезному объему аппарата.

В непрерывно действующем аппарате полного смешения (хемостате) среда все время обновляется за счет непрерывной подачи новых порций питательной среды и



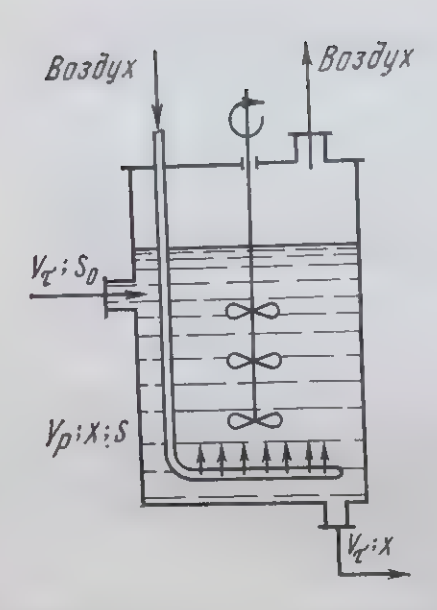


Рис. 9. Схема материальных потоков в непрерывно действующем аппарате полного смешения.

равновеликого по объему отбора культуральной жидкости вместе с клетками микроорганизма. Проток отрегулирован так, что концентрации веществ, биомассы микроорганизмов и продуктов обмена поддерживаются постоянными.

На рис. 9 приведена схема одиночного аппарата, работающего в непрерывном режиме, и показаны материальные потоки.

Уравнения материального баланса относительно биомассы и субстрата могут быть выражены следующим образом:

$$V_p\,dx = \mu x V_p\,d\tau - x v_\tau\,d\tau;$$

$$V_p\,dS = v_\tau S_0\,d\tau - v_\tau S d\tau - \alpha\mu_s x V_p\,d\tau, \quad (28)$$

где V_p — полезный объем аппарата, м³;
v_τ — скорость протока, м³/ч;
τ — время процесса, ч;
$V_p dx$ — изменение биомассы микроорганизмов за время $d\tau$, кг;
$\mu x V_p d\tau$ — количество биомассы, образующееся в аппарате за время $d\tau$, кг;
$x v_\tau\,d\tau$ — количество биомассы, отводимое из аппарата за время $d\tau$, кг;
$V_p dS$ — изменение количества субстрата в аппарате за время $d\tau$, кг;
$v_\tau S_0 d\tau$ — количество субстрата, подаваемое в аппарат за время $d\tau$, кг;
$v_\tau S d\tau$ — количество субстрата, отводимое из аппарата вместе с культуральной жидкостью за время $d\tau$, кг;
$\alpha\mu_s x V_p d\tau$ — количество субстрата, перешедшее в биомассу за время $d\tau$;
α — удельное потребление субстрата (трофический коэффициент), кг/кг;
μ_s — удельная скорость переработки субстрата, ч$^{-1}$.

Разделив правую и левую части уравнений (28) на $V_p x$, получим:

$$\frac{dx}{d\tau} = (\mu - D)\,x; \quad (29)$$

$$\frac{dS}{d\tau} = D\,(S_0 - S) - \alpha\mu_s x. \qquad (30)$$

Установившийся режим работы аппарата характеризуется условиями

$$\frac{dx}{d\tau} = 0; \quad \frac{dS}{d\tau} = 0.$$

Согласно уравнению (29) при установившемся режиме работы аппарата

$$\mu = D. \qquad (31)$$

Из уравнения (31) следует, что величина D сразу устанавливается равной μ и существование переходного режима в расчет не принимается. Однако эксперименты показывают, что переходный период существует.

Во время неустановившегося непрерывного культивирования $\mu \neq D$ и значение удельной скорости роста μ может быть определено вариацией концентрации биомассы.

Проинтегрируем уравнение (29) в пределах изменения концентраций биомассы микроорганизмов от x_0 до x и времени от 0 до τ при условии μ=const:

$$\int_{x_0}^{x} \frac{dx}{x} = \int_{0}^{\tau} (\mu - D)\, d\tau;$$

$$\ln\frac{x}{x_0} = (\mu - D)\,\tau;$$

$$x = x_0\, e^{(\mu - D)\tau}.$$

Возможны 3 случая:

1) $\mu > D$; $(\mu - D) > 0$ — концентрация биомассы микроорганизмов в аппарате возрастает (происходит накапливание биомассы);

2) $\mu = D$; $\mu - D = 0$ — стабилизация концентрации биомассы микроорганизмов в аппарате — выдерживается условие $x = x_0$;

3) $\mu < D$; $\mu - D < 0$ — концентрация биомассы микроорганизмов в аппарате убывает (происходит вымывание биомассы).

Графическое изображение изменения концентраций биомассы во времени для рассмотренных случаев приведено на рис. 10.

Характерной особенностью культивирования микроорганизмов является саморегулирование процесса (хемостатическое свойство), обусловленное обязательным наличием фактора, лимитирующего рост микроорганизмов. Экономически выгодно, чтобы таким фактором была концентрация субстрата, так как в этом случае можно определить условия, при которых субстрат наиболее полно перерабатывается в процессе выращивания микроорганизма. Коэффициент скорости роста культуры будет определяться концентрацией субстрата в культуральной жидкости. Если при непрерывном ведении процесса D станет меньше μ (случай первый), то концентрация биомассы микроорганизмов в аппарате начнет возрастать, а конечная концентрация субстрата — уменьшаться. С уменьшением конечной концентрации субстрата начнет уменьшаться значение μ до величины D, т. е. процесс стабилизируется.

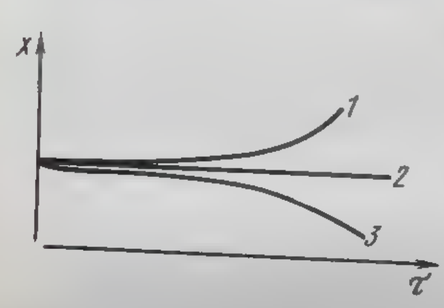


Рис. 10. Изменение концентрации микроорганизмов в непрерывно действующем аппарате полного смешения при различных соотношениях μ и D: *1* — $\mu > D$; *2* — $\mu = D$; *3* — $\mu < D$.

Непрерывному процессу в аппарате с полной стабилизацией параметров во времени соответствует второй случай.

Если при непрерывном ведении процесса D станет больше μ (третий случай), то концентрация биомассы микроорганизмов в аппарате начнет уменьшаться, а конечная концентрация субстрата — увеличиваться. Это приведет к увеличению значения μ до величины D, т. е. процесс также стабилизируется.

В результате саморегулирования процесса непрерывного культивирования микроорганизмов для каждого задаваемого произвольно (в ограниченных пределах) коэффициента разбавления D однозначно устанавливается равновесная конечная концентрация биомассы микроорганизмов.

Производительность G непрерывно действующего аппарата полного смешения для получения биомассы микроорганизмов определяется концентрацией биомассы

микроорганизмов и скоростью протока выводимой из аппарата культуральной жидкости:

$$G = v_\tau x. \tag{32}$$

Разделив левую и правую части этого уравнения на $V_р$, получим $G/V_р = v_\tau x/V_р$. Учитывая, что $G/V_р = g$, а $v_\tau/V_р = D$, продуктивность непрерывно действующего одиночного аппарата будет равна

$$g = Dx. \tag{33}$$

Для установившегося процесса, когда коэффициент разбавления равен удельной скорости роста биомассы ($D = \mu$), получаем

$$\bar{g} = \mu x, \tag{34}$$

где $\bar{g}$ — стационарная продуктивность аппарата по биомассе, кг СБ/(м^3·ч).

С учетом уравнений (4) и (5) уравнение (34) примет вид

$$\bar{g} = \frac{\mu_{max} K_{ps}}{\alpha} \cdot \frac{S(S_0 - S)}{(K_s + S)(K_{ps} + S_0 - S)}. \tag{35}$$

Из уравнения (35) видно, что стационарная продуктивность аппарата по биомассе зависит от значений исходной и остаточной концентраций субстрата.

На рис. 11 приведены кривые, характеризующие изменение стационарной продуктивности аппарата по биомассе $\bar{g}$ при различной исходной концентрации субстрата S_0 в функции остаточной концентрации субстрата S при выращивании дрожжей Candida tropicalis. Значения констант те же, что и в примере определения основных технологических показателей периодически действующего аппарата.

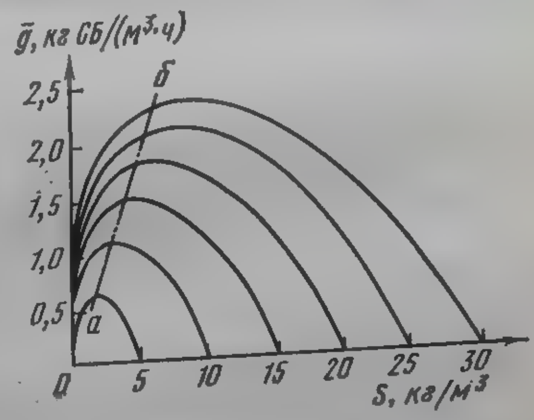


Рис. 11. Изменение стационарной продуктивности аппарата в зависимости от исходной и остаточной концентраций субстрата при выращивании дрожжей Candida tropicalis.

Каждая из кривых построена для фиксированного значения исходной концентрации субстрата S_0. Зависимость $\bar{g} = f(S)$ имеет экстремальный характер, т. е. одно и то же значение $\bar{g}$ может быть достигнуто при двух различных значениях остаточной концентрации субстрата.

Кроме того, с увеличением значений исходной концентрации субстрата S_0 стационарная продуктивность аппарата увеличивается.

Функция (35) достигает максимума при условии

$$\left(\frac{d\bar{g}}{dS}\right)_{S_0=\mathrm{const}} = 0. \qquad (36)$$

Значение остаточной концентрации субстрата $S_{ост}$, соответствующее максимальной продуктивности аппарата, можно найти из уравнения (35) при выполнении условия (36)

$$S_{ост} = \left[K_s(S_0 - K_{ps}) - \sqrt{K_s K_{ps}(S_0 - K_s)(S_0 - K_{ps})}\right] / (K_s - K_{ps}). \qquad (37)$$

Знак минус, стоящий перед корнем в числителе этого выражения, найден из условия физической реализуемости $0 < S < S_0$.

Подставив вместо S выражение для $S_{ост}$ в уравнение (35), можно получить зависимость максимально достижимой продуктивности данного аппарата $\bar{g}_{max}$ от исходной концентрации субстрата S_0 (экстремаль):

$$\bar{g}_{max} = \frac{\mu_{max} K_p}{\alpha} \cdot \frac{S_{ост}(S_0 - S_э)}{(K_s + S_{ост})(K_{ps} + S_0 - S_{ост})}.$$

Экстремаль, нанесенная на плоскости $\bar{g}$—S (см. рис. 11, линия *аб*), проходит через точки максимумов частных зависимостей ($S_{0max} = 30$ кг/м³ и $S_{0min} = 5$ кг/м³).

Величина остаточной концентрации субстрата $S_{ост}$ в стационарных условиях однозначно определяется режимом работы аппарата, т. е. заданным значением коэффициента разбавления D.

Так как $D = \mu$, выражение (4) может быть записано в виде

$$D = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \cdot \frac{K_{ps}}{K_{ps} + S_0 - S}, \qquad (38)$$

откуда можно найти $S = f(D)$:

$$S^2 + \left(\frac{\mu_{max} K_{ps}}{D} + K_s - K_{ps} - S_0\right) S - K_s(S_0 + K_{ps}) = 0; \qquad (39)$$

$$S = \left[\left(K_{ps} + S_0 - K_s - \frac{\mu_{max} K_{ps}}{D}\right) + \right.$$

$$\left. + \sqrt{\left(K_{ps} + S_0 - K_s - \frac{\mu_{max} K_{ps}}{D}\right) - 4K_s(K_{ps} + S_0)}\right] / 2. \qquad (40)$$

Знак плюс, стоящий перед корнем, также найден из условия $0 < S < S_0$.

Уравнение (39) справедливо в замкнутой области, ограниченной по D. Устойчивая работа непрерывно действующего аппарата возможна при условии $0<D<D_{кр}$.

Максимальное, или критическое, значение коэффициента разбавления $D_{кр}$ определяется из уравнения (38) при условии $S=S_0$

$$D_{кр}=\mu_{max}\frac{S_0}{K_s+S_0}. \qquad (41)$$

На рис. 12 приведены зависимости остаточной концентрации субстрата от коэффициента разбавления при

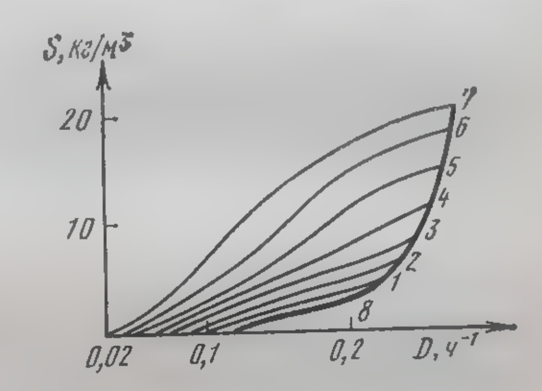


Рис. 12. Зависимость остаточной концентрации субстрата от коэффициента разбавления при различной исходной концентрации субстрата дрожжевой культуры Candida tropicalis (в кг/м³):

1 — 1,8; *2* — 9,4; *3* — 11,7; *4* — 13,5; *5* — 20,0; *6* — 25,0; *7* — 30,0; *8* — граница, соответствующая $D=D_{кр}$.

различных исходных концентрациях субстрата для дрожжевой культуры C. tropicalis. Граница $S=S_0$ (кривая 7), соответствующая области устойчивой работы, получена из уравнения (41).

Величину стационарной концентрации биомассы микроорганизмов в функции коэффициента разбавления получаем из уравнения (40) с учетом уравнения (5):

$$x=\left[\left(-S_0-K_{ps}+K_s+\frac{\mu_{max}K_{ps}}{D}\right)-\right.$$

$$\left.-\sqrt{\left(K_{ps}+S_0-K_s-\frac{\mu_{max}K_{ps}}{D}\right)^2+4K_s(K_{ps}+S_0)}\right]/2\alpha. \qquad (42)$$

Из уравнения (42) следует, что с увеличением коэффициента разбавления стационарное значение концентрации биомассы убывает. При $D\to D_{кр}=\mu_{max}S_0/(K_s+S_0)$ стационарное значение концентрации биомассы становится равным нулю.

На рис. 13 показана зависимость стационарной концентрации микроорганизмов от коэффициента разбавления при различных исходных концентрациях субстрата на примере культуры дрожжей C. tropicalis.

Зависимость стационарной продуктивности аппарата от коэффициента разбавления может быть найдена из

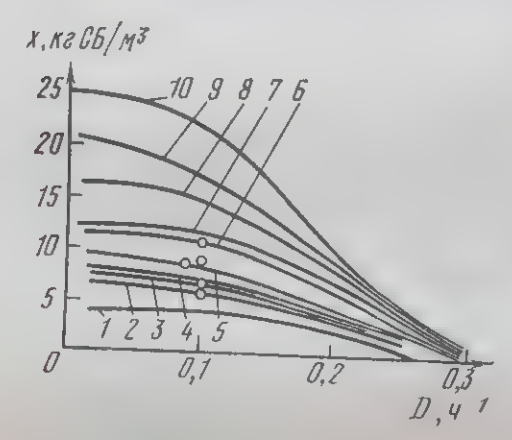


Рис. 13. Зависимость концентрации биомассы дрожжей культуры Candida tropicalis от коэффициента разбавления при различной исходной концентрации субстрата (в кг/м³):

1 — 5; *2* — 7,8; *3* — 9,36; *4* — 10; *5* — 11,1; *6* — 15; *7* — 16,6; *8* — 20; *9* — 25; *10* — 30.

соотношений, справедливых для установившегося процесса: $\mu = D$; $\bar{g} = \mu x$.

Значение $\bar{g}$ определяется из уравнения

$$\bar{g} = \frac{D}{2\alpha}\left[\left(-S_0 - K_{ps} + K_s + \frac{\mu_{\max} K_{ps}}{D}\right) - \right.$$

$$\left. - \sqrt{\left(K_{ps} + S_0 - K_s - \frac{\mu_{\max} K_{ps}}{D}\right)^2 + 4K_s (K_{ps} + S_0)}\right]. \quad (43)$$

На рис. 14 показана зависимость стационарной продуктивности аппарата от коэффициента разбавления для

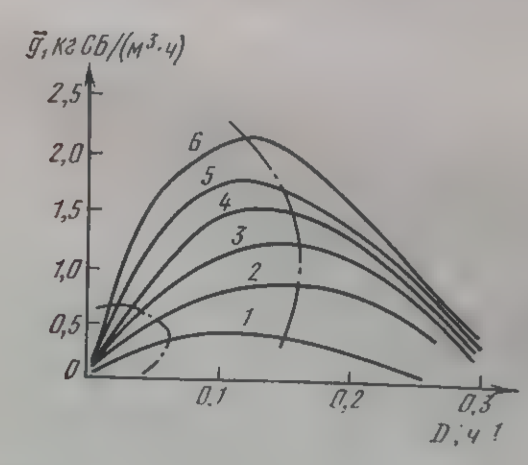


Рис. 14. Зависимость стационарной продуктивности аппарата от коэффициента разбавления при различных исходных концентрациях субстрата для дрожжевой культуры Candida tropicalis (в кг/м³):

1 — 5; *2* — 10; *3* — 15; *4* — 20; *5* — 25; *6* — 30.

той же культуры дрожжей при различных исходных концентрациях субстрата. Зависимость имеет экстремальный характер, и одна и та же продуктивность аппарата может достигаться (при заданной исходной концентрации субстрата) при двух различных коэффициентах разбавления (границы показаны пунктиром). Оптимальный режим работы аппарата по величине коэффициента разбавления может быть найден из уравнения (43) при условии

$$\left(\frac{d\bar{g}}{dD}\right)_{S_0} = 0.$$

При ведении экономически выгодного процесса концентрация субстрата на выходе из аппарата должна быть минимальной, что соответствует максимальному значению экономического коэффициента использования субстрата, который определяется как доля субстрата, непосредственно перешедшая в биомассу,

$$\eta = \frac{S_0 - S(D)}{S_0}. \tag{44}$$

С учетом уравнения (40) выражение для экономического коэффициента использования субстрата примет вид

$$\eta = \left[S_0 - K_{ps} + K_s + \frac{\mu_{\max} K_{ps}}{D} - \sqrt{\left(K_{ps} + S_0 - K_s - \frac{\mu_{\max} K_{ps}}{D}\right)^2 + 4K_s(K_{ps} + S_0)} \right] / 2S_0.$$

На рис. 15 показана зависимость экономического коэффициента использования субстрата от коэффициента разбавления при различных исходных концентрациях субстратов для культуры дрожжей Candida tropicalis.

Зависимость экономического коэффициента использования субстрата от продуктивности аппарата может быть найдена из уравнения (44) с использованием зависимости (35) $S = f(\bar{g})$, которую находят по графику функции.

Полученные зависимости экономического коэффициента использования субстрата от стационарной продуктивности аппарата приведены на рис. 16. Как видно из рисунка, коэффициент использования субстрата может принимать 2 различных значения при одной и той же

стационарной продуктивности аппарата при заданной исходной концентрации субстрата.

Рассмотренные закономерности относятся к случаю культивирования микроорганизмов, когда лимитирующими процесс факторами являются концентрации субстрата и метаболитов в культуральной жидкости.

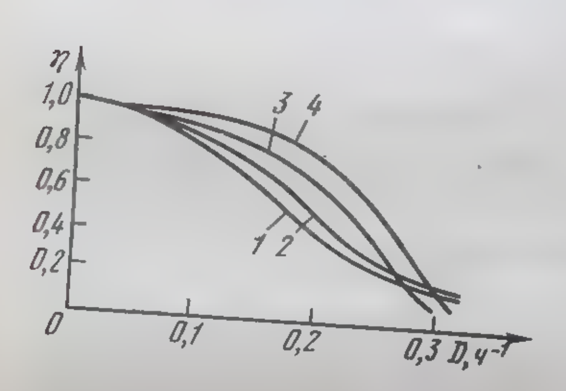


Рис. 15. Зависимость экономического коэффициента использования субстрата η от коэффициента разбавления D при различных исходных концентрациях субстрата при выращивании дрожжевой культуры Candida tropicalis (в кг/м³):

1 — 30; 2 — 20; 3 — 15; 4 — 10.

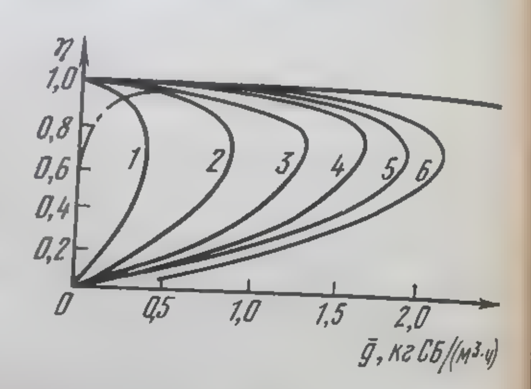


Рис. 16. **Зависимость экономического коэффициента использования субстрата η от стационарной продуктивности аппарата g и различной исходной концентрации субстрата при выращивании дрожжевой культуры Candida tropicalis (в кг/м³):**

1 — 5; 2 — 10; 3 — 15; 4 — 20; 5 — 25; 6 — 30.

§ 5. КИНЕТИКА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА В БАТАРЕЕ НЕПРЕРЫВНО ДЕЙСТВУЮЩИХ АППАРАТОВ ПОЛНОГО СМЕШЕНИЯ

В рассмотренном выше одиночном аппарате полного смешения скорость отбора биомассы мала, время пребывания культуры в аппарате в процессе культивирования возрастает, соответственно уменьшается скорость разбавления, снижается производительность.

Для увеличения производительности и экономического коэффициента, особенно на трудноусваиваемых субстратах, целесообразно процесс культивирования вести в простых однопоточных батареях с подачей субстрата в первый аппарат (рис. 17).

При однопоточной системе в каждом аппарате батареи условия жизнедеятельности микроорганизмов разные: в первом аппарате концентрация клеток наиболее

низкая по сравнению с другими аппаратами, а удельная скорость роста наиболее высокая. По мере снижения концентрации питательных веществ снижается и удельная скорость роста.

Работа каждого из последующих аппаратов отличается от первого тем, что во входящем жидкостном потоке кроме питательных веществ содержатся микроорганизмы, выращенные в предыдущих аппаратах.

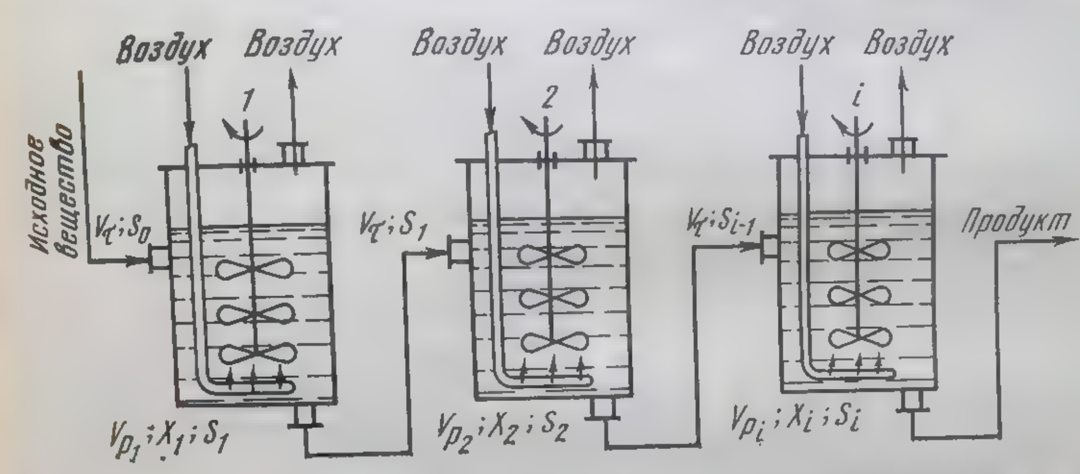


Рис. 17. Схема материальных потоков в однопоточной батарее непрерывно действующих аппаратов полного смешения для получения биомассы микроорганизмов.

Исходная концентрация лимитирующего субстрата для каждого последующего аппарата равна остаточной концентрации субстрата для предыдущего аппарата. Число аппаратов в батарее выбирается так, чтобы остаточная концентрация субстрата на выходе из последнего аппарата была меньше предельно допустимой.

Процесс культивирования в первом аппарате описывается уравнениями, приведенными выше, исходя из условия максимальной продуктивности.

Процесс культивирования в n-м аппарате батареи описывается дифференциальными уравнениями, аналогичными уравнениям (29) и (30):

$$\frac{dx_n}{d\tau} = D_n\left(x_{n-1} - x_n\right) + \mu_n x_n, \tag{45}$$

$$\frac{dS_n}{d\tau} = D_n\left(S_{n-1} - S_n\right) + \mu_n \alpha x_n, \tag{46}$$

где n — порядковый номер аппарата; $\mu_n = \mu_{max} \frac{S_n}{K_s + S_n} \times$
$\times \frac{K_{ps}}{K_{ps} + S_0 - S_n}$ [согласно уравнению (4)].

Стационарный режим работы батареи аппаратов характеризуется условиями: $\frac{dx_n}{d\tau} = 0$; $\frac{dS_n}{d\tau} = 0$.

Так как согласно уравнению (5) $x_n = \frac{S_0 - S_n}{\alpha}$, то выражение удельной скорости роста для n-го аппарата, полученное из уравнения (46), примет вид

$$\mu_n = D_n \frac{S_{n-1} - S_n}{S_0 - S_n}. \quad (47)$$

Подставляя в выражение (47) значение удельной скорости роста, получим

$$D_n (S_{n-1} - S_n) = \mu_{max} \frac{S_n}{K_s + S_n} \cdot \frac{K_{ps}}{K_{ps} + S_0 - S_n} (S_0 - S_n),$$

откуда

$$D_n = \frac{S_0 - S_n}{S_{n-1} - S_n} \mu_{max} \frac{S_n}{K_s + S_n} \cdot \frac{K_{ps}}{K_{ps} + S_0 - S_n}. \quad (48)$$

Определим для n-го аппарата батареи зависимость стационарного значения остаточной концентрации субстрата S_n от коэффициента разбавления D_n:

$$S_n^3 + \left(K_s - K_{ps} - S_0 - S_{n-1} + \frac{\mu_{max} K_{ps}}{D_n}\right) S_n^2 +$$
$$+ \left(S_{n-1} K_{ps} - K_s K_{ps} + S_{n-1} S_0 - K_s S_0 - K_s S_{n-1} -\right.$$
$$\left. - \frac{\mu_{max} K_{ps} S_0}{D_n}\right) S_n + S_{n-1} K_s K_{ps} + S_{n-1} K_s S_0 = 0. \quad (49)$$

Решение уравнения (49) должно удовлетворить условию физической реализуемости процесса ($0 < S_n < S_{n-1}$).

Найденные значения S_n позволяют произвести расчет параметров процесса в любом аппарате батареи, начиная со второго.

Стационарная продуктивность n-го аппарата батареи для установившегося процесса при $D=\mu$ согласно уравнениям (33)—(34) с учетом зависимости (5), равна

$$\bar{g}_n = D_n \frac{S_{n-1} - S_n}{\alpha}. \tag{50}$$

Напомним, что продуктивность выражается отношением количества синтезированной биомассы ко времени процесса. Тогда время оборота n-го ферментатора будет равно

$$T_n = \frac{1}{\bar{g}_n}\left(x_n - x_{n-1}\right) = \frac{1}{\bar{g}_n} \cdot \frac{S_{n-1} - S_0}{\alpha} = \frac{1}{D_n}.$$

Общая средняя стационарная продуктивность батареи $\bar{g}_{общ}$ может быть определена следующим выражением:

$$\bar{g}_{общ} = \frac{x_N - x_0}{\sum\limits_{n=1}^{N} T_n} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{S_0 - S_N}{T},$$

где T — время оборота всей батареи, ч $\left(T = \sum\limits_{n=1}^{N} T_n = \sum\limits_{n=1}^{N} \frac{1}{\bar{g}_n} \times \right.$

$$\left. \times \frac{S_{n-1} - S_n}{\alpha} = \sum_{n=1}^{N} \frac{1}{D_n}\right),$$

или

$$\bar{g}_{общ} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{S_0 - S_N}{\sum\limits_{n=1}^{N} \frac{1}{D_n}}. \tag{51}$$

Экономический коэффициент η для батареи аппаратов с 1-го по n-й включительно с учетом выражения (44) равен

$$\eta_{общ} = \frac{S_0 - S_n}{S_0}. \tag{52}$$

Производительность батареи аппаратов с учетом выражения (52) определяется по уравнению

$$G_{общ} = v_{\tau_1} x_n .$$

Порядок расчета батареи аппаратов

1. Выписывают константы процесса μ_{max}; K_s; K_{ps}; α.
2. Задаются исходной концентрацией субстрата S_0.
3. Определяют остаточную концентрацию субстрата в первом аппарате, соответствующую максимуму его продуктивности, по уравнению (37) с учетом $S_1 = S_{ост}$.
4. Определяют оптимальные параметры работы головного аппарата:

коэффициент разбавления D_1 — по уравнению (38);

стационарную продуктивность $\bar{g}_1$ — по уравнению (35);

концентрацию биомассы x_1 — по уравнению (5);

экономический коэффициент η — по уравнению (44).

5. Определяют оптимальные параметры работы второго аппарата батареи:

остаточную концентрацию субстрата S_2 по исходной для второго аппарата концентрации субстрата S_1 при коэффициенте разбавления $D_2 = D_1$ (при $V_{p2} = V_{p1}$) — по уравнению (49);

стационарную продуктивность $\bar{g}_2$ — по уравнению (50);

концентрацию биомассы x_2 — по уравнению (5);

суммарный коэффициент использования субстрата (экономический коэффициент) для первого и второго аппаратов $\eta_{1,2}$ — по уравнению (52);

суммарную стационарную продуктивность для первого и второго аппаратов $(\bar{g}_{1,2})_{общ}$ — по уравнению (51).

6. Каждый последующий (n-й) аппарат батареи рассчитывается по тем же соотношениям, что и второй аппарат.
7. Определяют число аппаратов в батарее из условия достижения величины остаточной концентрации субстрата, при которой его дальнейшее усвоение микроорганизмами экономически нецелесообразно.

§ 6. КИНЕТИКА РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ И ПОТРЕБЛЕНИЯ СУБСТРАТА В НЕПРЕРЫВНО ДЕЙСТВУЮЩЕМ АППАРАТЕ ПОЛНОГО СМЕШЕНИЯ С РЕЦИРКУЛЯЦИЕЙ БИОМАССЫ

Продуктивность непрерывно действующего аппарата полного смешения может быть существенно увеличена путем возврата в аппарат части отбираемой из него биомассы микроорганизмов, так как в этом случае более полно потребляется субстрат и возрастает η.

Схема потоков при возврате в аппарат части отбираемой из него биомассы представлена на рис. 18. В аппарат непрерывно поступает поток питательной среды

v_τ с исходной концентрацией субстрата S_0. Циркуляционный поток $v_\tau(n+1)$ (где n — коэффициент возврата) с концентрацией биомассы микроорганизмов x и субстрата S непрерывно выводится из аппарата в сепаратор. В сепараторе этот поток разделяется на 2 потока: 1-й поток v_τ с пониженной концентрацией биомассы $x_{отб}$ и концентрацией субстрата S в качестве продуктового потока выводится из системы; 2-й поток $v_\tau n$ с повышенной концентрацией биомассы микроорганизмов $x_{возв}$ и концентрацией субстрата S возвращается в аппарат.

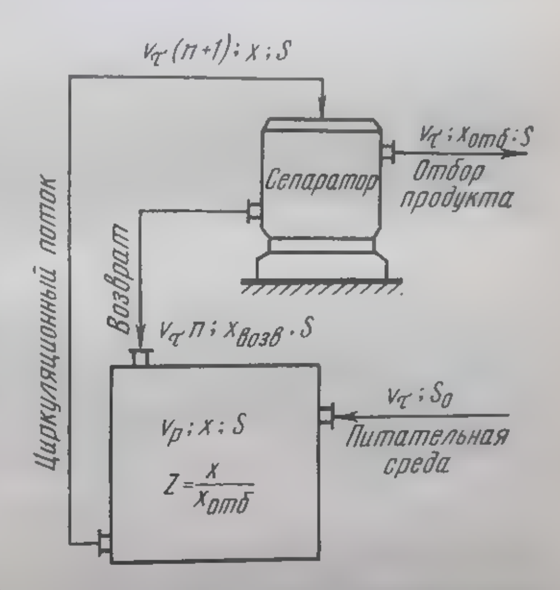


Рис. 18. Схема материальных потоков аппарата полного смешения с рециркуляцией биомассы микроорганизмов.

Изменение концентрации биомассы в аппарате происходит в результате возврата биомассы со 2-м потоком из сепаратора, прироста биомассы микроорганизмов в аппарате и отбора биомассы с циркуляционным потоком. Изменение концентрации субстрата в аппарате происходит в результате поступления субстрата с питательной средой, усвоения субстрата микроорганизмами, возврата субстрата со 2-м потоком из сепаратора и отбора субстрата с циркуляционным потоком.

Прирост биомассы в непрерывно действующем аппарате полного смешения с рециркуляцией биомассы описывается системой уравнений:

$$\left.\begin{aligned} \frac{dx}{d\tau} &= D_1 n x_{возв} - D_1 (n+1) x + \mu x; \\ \frac{dS}{d\tau} &= S_0 D_1 - D_1 (n+1) S + D_1 n S - \alpha x_{отб} z \mu; \\ \mu &= f(S), \end{aligned}\right\} \quad (53)$$

где $D_1 = v_\tau / V_p$ — коэффициент разбавления при работе аппарата с рециркуляцией биомассы микроорганизмов, $ч^{-1}$;

z — коэффициент, равный отношению концентрации биомассы в аппарате к концентрации биомассы в выводимом из аппарата продуктовом потоке.

Уравнения (53) материального баланса после преобразований для установившегося режима дают соотношение между коэффициентом разбавления и коэффициентом скорости роста микроорганизмов:

$$D_1 = z\mu. \tag{54}$$

Из этого соотношения следует, что скорость разбавления для аппарата с рециркуляцией биомассы микроорганизмов увеличивается во столько же раз, во сколько концентрация биомассы в аппарате превышает концентрацию биомассы в продуктовом потоке системы.

С учетом уравнения (54) выражение для определения стационарной продуктивности аппарата с рециркуляцией биомассы примет вид

$$\bar{g} = z\mu x_{\text{отб}} = z\frac{\mu_{\max} K_{ps}}{\alpha} \cdot \frac{S(S_0 - S)}{(K_s + S)(K_{ps} + S_0 - S)}.$$

Таким образом, в аппарате с рециркуляцией биомассы микроорганизмов при прочих равных условиях продуктивность в z раз больше, чем в аппарате без рециркуляции.

§ 7. КИНЕТИКА ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА МИКРООРГАНИЗМАМИ

Во всех предыдущих разделах продуктивность аппаратов с учетом режима их работы определялась как функция потребления микроорганизмом основного субстрата, учитывалось также влияние тормозящих рост факторов.

Не менее важен для жизнедеятельности аэробных организмов кислород, подводимый к клетке вместе с питательными веществами. Степень насыщенности среды кислородом и кинетика его потребления во многом определяют рост и развитие аэробных организмов.

В зависимости от вида микроорганизма и используемого им субстрата потребность в кислороде может быть различной. Для окисления углеводов требуется значительно меньше кислорода, чем для окисления углеводородов, поэтому аэрирующие и перемешивающие устройства при выращивании одного и того же

вида микроорганизма на этих двух субстратах будут различными.

Обычно **потребность в кислороде** определяется в килограммах кислорода на 1 кг сухой биомассы микроорганизма за 1 ч роста культуры с учетом вида окисляемого субстрата. Для обеспечения микроорганизма кислородом в среду подается воздух, но так как кислород обладает низкой растворимостью в культуральной жидкости, возникает необходимость интенсивного перемешивания среды с воздухом с помощью различных приспособлений, увеличивающих путь перемещения пузырька воздуха в среде и уменьшающих его размеры.

Одновременно с обеспечением растущей культуры кислородом аэрация и перемешивание среды способствуют удалению из среды образовавшихся газообразных метаболитов и лучшему освобождению поверхности клетки от выделяющихся продуктов обмена веществ, а также транспорту питательных веществ к клетке.

В культуральной жидкости непрерывно протекают 2 процесса: абсорбция кислорода жидкостью и потребление кислорода микроорганизмом. Следовательно, концентрация кислорода будет определяться соотношением скоростей адсорбции и потребления.

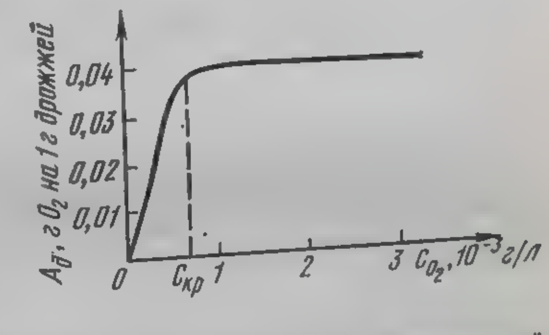


Рис. 19. Зависимость дыхательной активности дрожжей $A_д$ от концентрации растворенного кислорода C_{O_2}.

Концентрация растворенного кислорода C влияет на физиологические свойства микроорганизма. При увеличении C в среде скорость потребления кислорода повышается, что в свою очередь приводит к повышению скорости роста культуры и образования продукта.

Для каждого вида микроорганизма существует **критическая концентрация** растворенного кислорода $C_{кр}$ (рис. 19). Если концентрация растворенного кислорода больше $C_{кр}$, то дыхательная активность ($A_д$) пропорциональна относительной скорости синтеза биомассы (последняя определяется запасом субстрата

в среде и не зависит от концентрации растворенного кислорода). Если концентрация растворенного кислорода меньше $C_{кр}$, то дыхательная активность не соответствует потребностям культуры в кислороде. В этом случае относительная скорость синтеза биомассы является функцией дыхательной активности, а изменение дыхательной активности определяется закономерностью изменения концентрации растворенного кислорода.

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса — Ментен:

$$\mu = \mu_{\max C} \frac{C}{K_{\max C} + C},$$

где $\mu_{\max C}$ — предел скорости роста микроорганизма при значительном увеличении концентрации кислорода, растворенного в культуральной жидкости, $ч^{-1}$;

$K_{\max C}$ — концентрация кислорода, растворенного в культуральной жидкости, при которой удельная скорость роста микроорганизмов $\mu = 0{,}5\mu_{\max C}$, кг/м³.

Коэффициент скорости роста микроорганизма остается постоянным в широком диапазоне изменения концентрации кислорода, растворенного в культуральной жидкости (см. рис. 19).

Скорость дыхания большинства микроорганизмов резко падает при содержании растворенного кислорода в среде $(0{,}004 \div 0{,}02)\ 10^{-3}$ моль/л. Нормальными считаются такие условия аэрации, при которых концентрация растворенного в среде кислорода незначительно превышает критическую.

Растворимость кислорода зависит от температуры культуральной жидкости, давления, количества биомассы, плотности, вязкости, состава и pH питательной среды, наличия пеногасителей, интенсивности перемешивания, продолжительности контакта пузырьков воздуха с жидкостью, дисперсности газа и т. д.

Количество кислорода (M), абсорбирующееся жидкой средой в единицу времени (кг/ч), будет равно

$$M = \beta_ж F (C_1 - C),$$

где $\beta_ж$ — коэффициент массопередачи в жидкой фазе, м/ч;

F — величина суммарной поверхности раздела фаз, м²;

C_1 — концентрация растворенного кислорода у поверхности раздела фаз, кг/м³;

C — концентрация растворенного кислорода в жидкой фазе, кг/м³.

Величины F и C_1 обычно неизвестны. Рационально ввести понятие объемного коэффициента массоотдачи $\beta_C = Q\beta_ж$, где Q — удельная межфазовая поверхность, м²/м³. Учитывая, что с хорошим приближением $C_1 = C_р$, можно записать

$$M = \beta_C (C_р - C) v_р,$$

где $C_р$ — равновесная концентрация кислорода в жидкой фазе, соответствующая определенному парциальному давлению кислорода в газообразной фазе, кг/м³.

Уравнение материального баланса с учетом потребления кислорода микроорганизмами запишется следующим образом:

$$V_р \, dC = \beta_C (C_р - C) v_р \, d\tau - x b v_р \, d\tau,$$

где $V_р dC$ — изменение количества растворенного кислорода в аппарате за время $d\tau$, кг;

$\beta_C (C_р - C) v_р \, d\tau$ — количество кислорода, адсорбированное питательной жидкой средой за время $d\tau$, кг;

β_C — объемный коэффициент массоотдачи, т. е. количество кислорода, диффундируемое за 1 ч через удельную (отнесенную к единице объема) межфазную поверхность при разности равновесной и текущей концентраций кислорода, равной единице, ч⁻¹;

$x b v_р d\tau$ — количество кислорода, потребленное за время $d\tau$ микроорганизмами, кг;

x — концентрация биомассы, кг/м³;

b — дыхательная активность или удельная скорость потребления кислорода единицей массы микроорганизмов за время $d\tau$, ч⁻¹.

Можно принять $C_р = C_{р0}$, где $C_{р0}$ — равновесная концентрация, соответствующая парциальному давлению кислорода в подаваемом на аэрацию воздухе.

При культивировании аэробных микроорганизмов необходимо знать время практического достижения равновесной начальной концентрации растворенного кислорода $C_{р0}$. Оно зависит от величины коэффициента массоотдачи β_C и даже в неинтенсивно аэрируемых аппаратах составляет не более 5 мин (после начала аэрации). Следовательно, на практике можно считать, что культуральная жидкость всегда достаточно насыщена кислородом, так как микробиологические процессы идут медленно и интервал времени 5 мин незначителен по сравнению с продолжительностью микробиологического процесса.

Минимальное значение коэффициента массоотдачи $(\beta_C)_{min}$, которое должно быть обеспечено конструкцией и режимом работы аппарата, определяется зависимостью

$$(\beta_C)_{min} = \frac{b}{qC_{p0}} x_к,$$

где q — разность равновесной и рабочей концентраций кислорода в культуральной жидкости, выраженная в долях равновесной концентрации;

$x_к$ — концентрация биомассы на выходе из аппарата.

Величина β_C, с одной стороны, определяется конструкцией аппарата, с другой — физико-химическими свойствами культуральной жидкости. Чтобы полнее использовался кислород, изменению подлежат конструктивные элементы аппаратов (их геометрические формы и размеры, мощность электродвигателя мешалки, тип мешалки, конструкция барботажных устройств и т. п.).

Величину коэффициента массоотдачи в аппарате можно менять, изменяя частоту вращения мешалки или величину расхода аэрирующего воздуха. На практике второй способ не нашел применения, так как коэффициент массоотдачи при изменении расхода аэрирующего воздуха меняется незначительно, и, кроме того, при увеличении количества воздуха резко повышается способность к пенообразованию.

Для определения оптимальных условий аэрирования культуры первоначально устанавливаются массообменные характеристики аппарата и экспериментально обосновываются наиболее экономически и технологически выгодные режимы выращивания.

Часть II

ТЕХНОЛОГИЯ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Основное количество белковых препаратов микробного происхождения производится в виде микробных масс, получаемых путем выращивания микроорганизмов на самом разнообразном сырье, содержащем источники углерода и другие биогенные элементы.

Независимо от вида используемого сырья технологический процесс производства микробных белковых препаратов состоит из следующих основных стадий: подготовка сырья и приготовление питательных сред для выращивания микроорганизмов; культивирование микроорганизмов; выделение биомассы продуцента из культуральной жидкости; плазмолиз клеток; сушка биомассы; фасовка и упаковка готового препарата.

Наибольшие различия в технологии микробных белковых препаратов имеют место на первой стадии технологического процесса — при подготовке сырья к последующему выращиванию микроорганизмов. Остальные пять стадий почти не различаются для любого вида перерабатываемого сырья. Поэтому целесообразно рассмотреть принципиальную технологическую схему получения микробных масс, а затем более подробно и обстоятельно остановиться на технологических особенностях подготовки питательных сред на различном исходном сырье и выращивания на них микроорганизмов.

Глава 1. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Процесс получения микробных белковых препаратов слагается из нескольких стадий, каждая из которых состоит из ряда операций (схема 1). Рассмотрим ос-

Схема 1 Основные стадии процесса производства микробных белковых препаратов

	Сырье
Пар Воздух Кислоты, щелочи и другие химические агенты	Подработка сырья (измельчение, гидролиз, освобождение от токсических веществ и т. д.)
Воздух Пар Питательные вещества	Приготовление питательной среды
Чистая культура продуцента Вода Пар Воздух	Культивирование микроорганизма
Вода	Отделение биомассы продуцента от жидкой фазы и ее промывка
Пар	Концентрирование биомассы и плазмолиз клеток
Нагретый воздух	Высушивание микробной пасты до влажности 8—10%
	Фасовка и упаковка готового препарата
	Готовый микробный белковый препарат

новные стадии получения микробных белковых препаратов в самом общем виде, начиная с характеристики исходного сырья.

§ 1. СЫРЬЕ

Для выращивания микроорганизмов могут использоваться различные виды сырья: отходы древесного и сельскохозяйственного растительного сырья, сульфитные щелоки, жидкие и газообразные углеводороды, метиловый и этиловый спирты, отходы производств пищевой промышленности и т. д.

Различный состав сырья, неодинаковые количественные и качественные характеристики источников углерода, азота и других необходимых для жизнедеятельности микроорганизмов соединений не позволяют получать одно и то же количество биомассы из единицы перерабатываемого сырья, что видно из показателей, приведенных ниже.

Вид сырья	Выход биомассы микроорганизма из 1 кг абсолютно сухого сырья, кг
Отходы древесного и сельскохозяйственного сырья	0,18—0,22
Сульфитные щелоки	0,01—0,02
н-Парафины	0,80—1,00
Газообразные углеводороды	0,80—1,00
Метиловый спирт	0,40—0,45
Этиловый спирт	0,45—0,50
Свекловичная меласса	0,22—0,26
Молочная сыворотка	0,02—0,03

Примечание. Промышленного культивирования микроорганизмов на природном газе, метиловом и этиловом спиртах в настоящее время нет. Цифры приведены расчетные.

Древесное сырье представляет собой многолетние растительные ткани, содержащие целлюлозу, лигнин, пентозаны, гемицеллюлозы и некоторые другие вещества, образующие клеточный матрикс в растительной ткани. В этом виде сырья источником углерода для микроорганизмов могут быть гексозы, пентозы, органические кислоты. В свободном состоянии, доступном для усваивания микроорганизмами, они в сырье практически отсутствуют, поэтому его подвергают предваритель-

ной обработке: измельчают и гидролизуют, при этом полисахариды древесины при высоких температурах в присутствии кислот или щелочей переходят в низкомолекулярные соединения. Содержание полисахаридов и редуцирующих веществ (РВ) при гидролизе различных пород древесины и коры приведено в табл. 5.

Таблица 5

Порода	Содержание РВ, %			Содержание полисахаридов, %	
	общее	пентоз	гексоз	легкогидролизуемых	трудногидролизуемых
Древесина					
Ель	66—72	5—6	63—66	16—17	46—49
Сосна	62—73	5—6	62—66	16—19	40—48
Лиственница	69—73	8—9	51—54	21—28	37—41
Береза	69—73	24—25	44—45	25—28	36—40
Осина	70—71	18—19	50—51	20—21	40—44
Дуб	64—70	18—19	44—49	20—21	37—42
Кора					
Осина	56—57	15—17	35—37	30—32	19—20
Дуб	32—34	4—5	24—25	13—14	16—17
Береза (без бересты)	36—38	16—18	19—20	18—20	16—18

Помимо отходов деревообрабатывающей промышленности источником целлюлозосодержащего сырья являются разнообразные отходы растительного сельскохозяйственного сырья: хлопковая шелуха, кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая шелуха, солома, а также некоторые растения (камыш, стебли хлопчатника, гуза-пай и др.).

Хлопковая шелуха представляет собой твердую оболочку семян хлопчатника, покрытую короткими волокнами хлопка. Она является отходом хлопкоочистительных и маслобойных заводов.

Химический состав хлопковой шелухи зависит от сорта хлопчатника. Обычно она содержит целлюлозу

(36—48%), лигнин (20—31%) и пентозаны (21—28%). Максимальный выход РВ при гидролизе хлопковой шелухи — 65—67%, в том числе пентоз 22—23 и гексоз 37—39%.

Для более полного использования полисахаридов на гидролизных заводах хлопковую шелуху перерабатывают по комплексной схеме, используя пентозы для производства ксилитана, а гексозы — для выработки дрожжей. Количество хлопковой шелухи, перерабатываемой на гидролизных заводах, в общем сырьевом балансе имеет незначительный удельный вес.

Кукурузная кочерыжка, т. е. стержень, оставшийся после отделения кукурузных зерен от початков (выход кочерыжки составляет 25—35% от массы початков), содержит до 39% легкогидролизуемых и до 37% трудногидролизуемых полисахаридов. В составе легкогидролизуемых полисахаридов 32% составляют пентозаны, в составе трудногидролизуемых — 28,6% целлюлозы. Общий выход РВ при гидролизе составляет 79—83%, в том числе пентоз 35—39 и гексоз 41—43%. Кукурузная кочерыжка используется в качестве технологического сырья для получения кормовых дрожжей на гидролизных заводах.

Подсолнечная лузга является отходом производства масла из семян подсолнечника. Выход ее составляет около 50% от массы перерабатываемых семян. Подсолнечная лузга содержит 19—22% легкогидролизуемых и до 25% трудногидролизуемых полисахаридов, общий выход РВ 46—56%, в том числе пентоз 20 и гексоз 28%. Это сырье не очень перспективно, так как объемы его невелики и химический состав менее благоприятен по сравнению с другими видами сырья.

Рисовая шелуха, также используемая в качестве сырья для гидролизного производства, содержит 18% легкогидролизуемых и 29% трудногидролизуемых полисахаридов. Общий выход РВ 50—56%. Рисовая шелуха сохраняет хорошую фильтрующую способность в течение всего процесса ее обработки, что обеспечивает высокий выход гидролизата.

Гуза-пай (стебли хлопчатника, произрастающего в Казахстане и Средней Азии) может, так же как камыш и солома, служить сырьем для гидролизного производ-

ства в местных условиях. Общий выход РВ при гидролизе гуза-пая составляет 65%.

Хорошим, но, к сожалению, очень небольшим и рассредоточенным источником усвояемых углеводов являются **отходы пивоваренного производства** (пивная дробина и солодовые ростки), а также **отходы подработки несоложеного ячменя.** Для получения кормовых дрожжей это сырье соответствующим образом гидролизуют и вводят в среду в соотношении 8 : 0,2 : 0,05 (дробина : ростки : отходы ячменя).

Сырьем для производства кормовых дрожжей может служить **верховой малоразложившийся торф.** Химический состав торфа во многом повторяет химический состав растений, из которых он образовался, причем чем меньше степень разложения торфа, тем больше его состав приближается к составу растительного сырья.

Верховой торф со степенью разложения 15—20% содержит 25—27% легкогидролизуемых и 9—13% трудногидролизуемых полисахаридов, 0,7—4,0% азотсодержащих соединений, основная часть которых входит в состав гуминовых веществ, 7—10% аминокислот.

К отходам картофелекрахмального производства, являющимися субстратом для выращивания микроорганизмов, относятся клеточный сок картофеля, промывные воды после гидросмыва крахмала и соковые воды (клеточный сок картофеля, разбавленный водой).

Клеточный сок картофеля содержит 3% сухих веществ (СВ), выход РВ составляет 87% от массы картофеля. Большинство заводов работают без выделения клеточного сока.

Промывные воды после гидросмыва крахмала содержат до 0,16% крахмала, количество их составляет 170—270% от массы перерабатываемого крахмала.

Соковые воды содержат 0,6—1,0% сухих веществ. В состав сухих веществ входят (в %): белки — 28, азотистые небелковые вещества — 22, углеводы — 38, минеральные вещества — 12. Этих вод на предприятиях накапливается около 600% к массе перерабатываемого картофеля.

Концентрация полисахаридов в этих видах субстратов (крахмала, клетчатки) крайне низка, поэтому предварительный гидролиз их экономически неоправдан.

Для производства белка на этом виде сырья используются культуры микроорганизмов, обладающие сильным гидролитическим комплексом ферментов, способные расти на полисахаридах и усваивать их.

Субстратом для выращивания микроорганизмов, продуцирующих белок, могут служить отходы пищевой промышленности, не требующие специальных методов обработки. Эти виды отходов содержат источники углеводов, непосредственно усваиваемые микроорганизмами. К таким отходам прежде всего относятся меласса, последрожжевая барда спиртовых заводов, молочная сыворотка.

Свекловичная меласса — отход производства сахара из свеклы, богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45—60% сахарозы, 0,25—2,0% инвертного сахара, 0,2—3,0% рафинозы. Кроме того, в мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные соединения, микроэлементы, а также некоторые витамины. Однако для производства кормовых дрожжей сахарная меласса используется крайне редко, так как она является сравнительно дорогим и дефицитным сырьем.

Мелассная барда является отходом мелассно-спиртового производства. Химический состав барды зависит от состава исходной мелассы и колеблется в широких пределах. По своему химическому и витаминному составу мелассная барда является полноценным сырьем для производства кормовых дрожжей, не требующим добавок ростовых веществ. Сухих веществ в натуральной барде содержится 8—12%, в упаренной барде — 53,0%.

Зерно-картофельная барда — отход спиртового производства. Содержание растворимых сухих веществ в зерно-картофельной барде обычно составляет от 2,5 до 3,0%, в том числе 0,2—0,5% редуцирующих веществ, имеются источники азота и микроэлементы.

Барда ацетоно-бутилового производства содержит до 0,7—1,0% редуцирующих веществ, азотистые вещества, минеральные соли и стимуляторы роста. В этом виде сырья присутствует небольшое количество бутанола (до 0,07—0,30 г/л), что вызывает необходимость адаптации к нему микроорганизмов.

Молочная сыворотка в последние годы все чаще рассматривается как сырье для получения обогащенных белком микробных масс. Сыворотки могут быть различны по составу в зависимости от технологии переработки цельного или обезжиренного молока. Молочные сыворотки очень богаты различными биологически активными соединениями, они содержат в среднем 70—80% лактозы, 7—15 — белковых веществ, 2—8 — жира, 8—10% минеральных солей. Кроме того, молочные сыворотки имеют в своем составе значительное количество витаминов, гормонов, органических кислот, микро- и ультрамикроэлементы.

Для производства богатых белком микробных масс и липидов в качестве источника углерода могут быть использованы продукты нефтеперерабатывающей промышленности, например *н*-парафины. Кроме того, с помощью микроорганизмов можно, минуя традиционные способы выделения *н*-парафинов из топлива, осуществить депарафинизацию нефтепродуктов. Для этого определенные микроорганизмы, потребляющие в процессе жизнедеятельности парафины, выращивают непосредственно на данном нефтепродукте. В этом случае одновременно получают высококачественное топливо и микробный белок.

Наиболее перспективным сырьем для микробиологической промышленности являются **жидкие *н*-парафины** с числом углеродных атомов от 10 до 20 и температурой застывания от —10 до +30° С. Этот вид сырья позволяет получать выход дрожжей 100% и более к массе потребленных углеводородов. Наиболее крупным источником *н*-парафинов являются высоко- и среднепарафинистые нефти.

Для микробиологической промышленности большой интерес представляют **газообразные углеводороды:** метан, этан, бутан, пропан. Весьма перспективным источником углерода является природный газ, который на 80—90% состоит из метана. При выращивании микроорганизмов на этом виде сырья существенно упрощается процесс очистки получаемой микробной массы от остаточных углеводородов и других примесей.

Другие углеводороды с длиной цепи 5—9 углеродных атомов (экстракционный бензин) не потребляются микроорганизмами, а твердые углеводороды с длиной

цепи более 20 углеродных атомов усваиваются очень медленно.

В последнее время все больше внимания уделяется в микробиологической промышленности **окисленным углеводородам,** которые являются весьма экономичным сырьем в производстве микробного белка. Источниками окисленных низкокипящих углеводородов могут служить попутные газы, газы газоконденсатных месторождений и газы нефтеперерабатывающих заводов.

Отходы некоторых химических производств (производства капролактама, глицерина и др.), содержащие окисленные продукты, также могут быть использованы в качестве сырья для производства кормовых дрожжей.

Культивировать микроорганизмы можно на водных и водно-щелочных **экстрактах бурых и каменных углей,** так как в твердом состоянии горючие твердые ископаемые ассимилируются микроорганизмами очень медленно и наблюдается лишь незначительное накопление биомассы.

В последнее время намечается использование еще одного вида сырья для микробиологической промышленности — **углекислого газа.** В этом случае продуцентом белка являются бактерии, способные окислять водород и использовать образующуюся при этом энергию для ассимиляции растворенной в жидкой фазе среды углекислоты. Но этот вид сырья еще проходит апробацию в лабораторных условиях.

При использовании для приготовления питательных сред большинства перечисленных источников сырья, особенно гидролизатов древесины, сульфитных щелоков, различных видов углеводородного сырья, необходимо вносить в среду дополнительные источники азотного и фосфорного питания, витамины, микроэлементы. Обычно для обогащения питательных сред используют кукурузный экстракт, дрожжевые автолизаты или гидролизаты, отходы производства витамина D_2 в виде D-комплекса и «щелочного экстракта», отходы производства витамина E, лимонной кислоты и др. Все эти отходы содержат значительные количества витаминов, особенно биотина, а также азот, фосфор, калий. Добавление этих отходов даже в небольшом количестве (5—10% к объему среды) позволяет повы-

сить выход дрожжей на 6—15%. Очень часто в состав питательных сред вносят минеральные соли, содержащие азот, фосфор, калий и другие элементы. Дополнительным источником азота в среде является аммиак, с помощью которого обычно поддерживают pH среды на определенном уровне.

§ 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Следующей основной стадией технологического процесса производства микробных белковых препаратов (см. схему 1) является культивирование микроорганизмов. В период пуска производства эта стадия слагается из подготовки исходного посевного материала и выращивания его в промышленных ферментаторах с последующим отделением образовавшихся микробных масс от жидкой фазы среды. При установившемся производстве чистую культуру посевного материала подают в ферментаторы для постоянного обновления культуры. Поэтому независимо от способа культивирования и периода работы завода процесс выращивания микроорганизмов имеет 2 ступени:

1 — получение чистой культуры посевного материала;

2 — выращивание микробных масс в промышленных ферментаторах.

Получение чистой культуры посевного материала

Посевным материалом называют чистую культуру микроорганизма, которая получается путем ее последовательного пересева из пробирки в колбу, а затем в аппараты увеличивающегося объема, вплоть до большого посевного аппарата, из которого она передается в производство при вводе в работу очередного ферментатора, или в работающий ферментатор для поддержания в нем роста основной культуры продуцента.

Приготовление посевного материала производится по стадиям (рис. 20):

1 — получение культуры микроорганизма в микробиологической лаборатории завода;

2 — выращивание дрожжей в малом посевном аппарате;

3 — выращивание дрожжей в большом посевном аппарате;

4 — накопление культуры микроорганизма в малом ферментаторе (который также называют большим инокулятором);

5 — накопление культуры микроорганизма в промышленном ферментаторе (для заводов большой производительности).

П е р в а я   с т а д и я   в ы р а щ и в а н и я   п о с е в н о г о   м а т е р и а л а осуществляется в заводской микро-

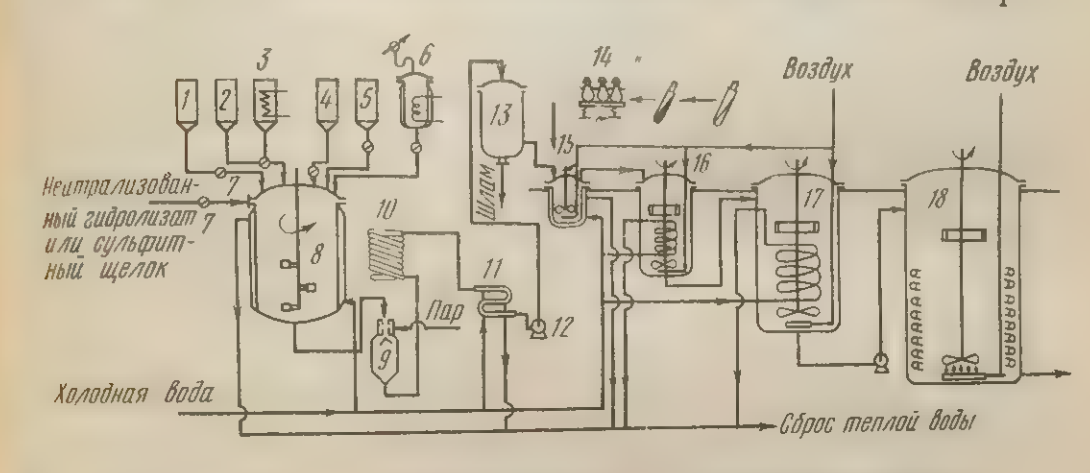


Рис. 20. Схема получения чистой культуры посевного материала:

1—5 — сборники компонентов питательной среды (*1* — сульфата аммония; *2* — суперфосфата; *3* — горячей воды; *4* — известкового молока; *5* — хлористого кальция); *6* — дрожжевой автолизатор; *7* — дозирующие устройства; *8* — реактор для приготовления питательной среды; *9* — греющая колонка; *10* — выдерживатель; *11* — теплообменник; *12* — центробежный насос; *13* — отстойник; *14* — стадия приготовления чистой культуры засевных дрожжей в лаборатории; *15, 16* — малый и большой посевные аппараты; *17* — малый ферментатор; *18* — промышленный ферментатор.

биологической лаборатории. При этом ставится задача сохранить исходный штамм в неизменном состоянии.

Споры микроорганизмов, которые образованы неполовым путем, представляют собой наилучшую форму сохранения исходной, музейной культуры продуцента биологически активных веществ. Однако при длительном хранении даже совершенно однородных клеток и спор могут возникнуть спонтанные нерегулируемые мутации. Поэтому необходимо не только соблюдать правила хранения и поддержания исходной культуры, но и периодически проводить рассев культуры и проверку ее однородности как по морфологическим, так и по физиологическим признакам. При рассеве из колонии,

культуры микроорганизма в промышленном ферментаторе (для заводов большой производительности).

Первая стадия выращивания посевного материала осуществляется в заводской микро-

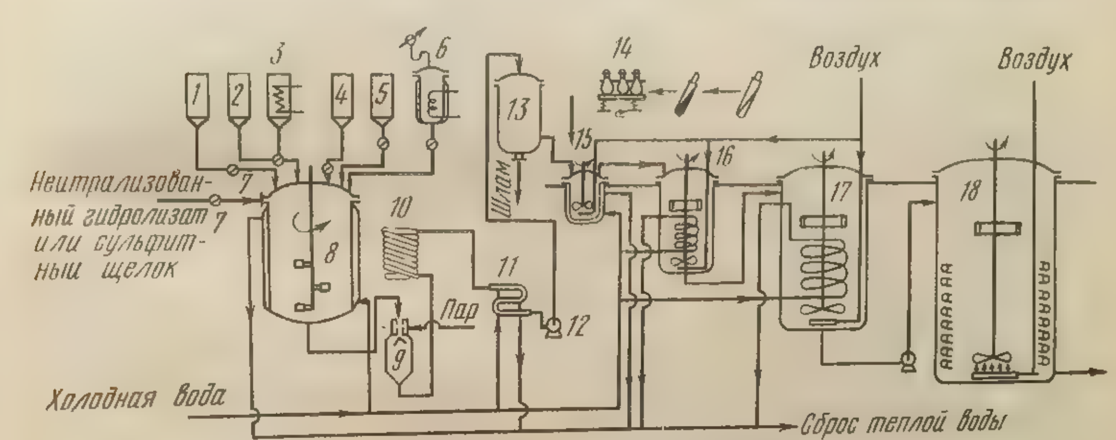


Рис. 20. Схема получения чистой культуры посевного материала:

1—5 — сборники компонентов питательной среды (*1* — сульфата аммония; *2* — суперфосфата; *3* — горячей воды; *4* — известкового молока; *5* — хлористого кальция); *6* — дрожжевой автолизатор; *7* — дозирующие устройства; *8* — реактор для приготовления питательной среды; *9* — греющая колонка; *10* — выдерживатель; *11* — теплообменник; *12* — центробежный насос; *13* — отстойник; *14* — стадия приготовления чистой культуры засевных дрожжей в лаборатории; *15, 16* — малый и большой посевные аппараты; *17* — малый ферментатор; *18* — промышленный ферментатор.

биологической лаборатории. При этом ставится задача сохранить исходный штамм в неизменном состоянии.

Споры микроорганизмов, которые образованы неполовым путем, представляют собой наилучшую форму ...одной, музейной культуры продуцента

давшей наилучшие показатели на диагностирующей среде, делают новый рассев в 30—40 пробирок. Затем из каждых 5—6 пробирок отбирают одну и проверяют находящийся в ней микроорганизм на способность образовывать то вещество, продуцентом которого он является, например белок или липиды. Проведение такой непрерывной селекции позволяет сохранить в активной форме исходную культуру продуцента.

Однородный штамм микроорганизма высевают в пробирки на скошенные агаризованные среды оптимального для каждого штамма состава и выращивают его до определенного возраста в оптимальных условиях.

Готовую культуру в пробирках помещают в холодильник и хранят при температуре 3—4° С. Пересевы культур проводят через определенные промежутки времени с таким расчетом, чтобы наилучшим образом сохранить физиолого-биохимические свойства штамма. Длительные промежутки между пересевами недопустимы, так как микроорганизм в процессе роста и хранения потребляет из среды питательные вещества и накапливает продукты обмена, вредно влияющие на его свойства. При пересевах следует переносить только споры или небольшие кусочки мицелия без питательной среды, чтобы в свежую питательную среду не вносить продукты метаболизма. Для длительного хранения некоторых штаммов целесообразно использовать бедные сахарами крахмальные среды.

Более длительное время можно хранить культуру под слоем вазелинового масла. Для этого целесообразно использовать вазелиновое масло медицинского назначения. Оно не должно содержать токсических и окисленных продуктов. Слой масла должен быть на 1 см выше агарового среза. Слишком большой слой масла может повлечь за собой гибель культуры из-за недостатка кислорода.

Культуру заливают стерильным маслом после того, как она достигнет полной физиологической зрелости. Для этого способа хранения наилучшей средой считается картофельно-мальтозный агар.

Известны способы хранения культур при температурах −11 ÷ −14° С. В этих условиях многие культуры полностью сохраняют активность в течение 10—16 мес.

Грибные и дрожжеподобные культуры успешно хра-

нят в замороженном состоянии в атмосфере жидкого азота при температурах $-165 \div -196°$ С. Культуры замораживают в 10%-ном водном растворе глицерина и помещают в ампулы, которые запаивают. Ампулы хранят в контейнере с жидким азотом. По данным микробиологов, даже после 5-летнего хранения микроорганизмы сохраняют все физиолого-биохимические свойства.

Перспективным следует признать способ хранения культур в лиофилизованном состоянии. Культуру микроорганизма помещают в защитную среду, замораживают и подвергают вакуумной лиофильной сушке. В качестве защитной среды можно использовать сахаро-желатинную среду. Клетки микроорганизма помещают в стерильные ампулы, закрывают стерильными ватными тампонами и быстро замораживают при температурах $-35 \div -78°$ С. Затем ампулы переносят в вакуум-сушильный аппарат и высушивают при комнатной температуре и остаточном давлении 1,0 — 10,0 Па в течение 25 — 30 ч. Лиофильно высушенные культуры могут сохраняться до 5 — 6 лет без потери способности к быстрому росту и накоплению целевого продукта. Этот способ, по мнению многих исследователей, наиболее эффективен.

Штамм можно хранить длительное время в стерильной почве. Для этого почву стерилизуют и вносят в нее культуру продуцента. При возобновлении культуры смыв с почвы высевают на чашки Петри и выделяют на косой питательный агар.

Часто штамм хранят на зерне, например на пшене. Для этого пшено, очищенное от примесей, кипятят в минимальном количестве воды до полного поглощения влаги (на 1 кг пшена 800 мл воды), распаривают в течение 30 мин, высыпают на чистый стол, разбирают образовавшиеся комки и остывшее пшено по 15 — 16 г засыпают в стерильные флаконы объемом 250 мл, которые затем стерилизуют при давлении 0,1 МПа в течение 40 мин. На стерильное распаренное пшено наносят 2 мл густой взвеси конидий или 3 мл двухсуточной вегетативной биомассы продуцента, выращенного в колбах на качалках. Культуру продуцента выращивают при периодическом встряхивании при температуре 25 — 30° С. Выросшую культуру высушивают в ва-

кууме при температуре 25° С в течение 60—70 ч до влажности пшена (7—8%).

Хранящиеся в заводской микробиологической лаборатории чистые культуры микроорганизмов по мере необходимости подаются в производство. Для этого штамм микроорганизма из пробирки переносят в конические колбы с питательной средой, состав которой соответствует составу среды, используемой в производстве. Колбы помещают на качалки в оптимальные условия и контролируют развитие в них микроорганизмов. Затем инразводку чистой культуры, находящейся в стадии интенсивного роста, задают в малый посевной аппарат *15* (см. рис. 20) с подготовленной питательной средой.

Питательную среду готовят в специальном реакторе *8*, снабженном рубашками для подогрева и мешалкой. Компоненты питательной среды подаются в реактор через дозирующие устройства *7*, pH среды доводится до 5,5—5,8 известковым молоком. Главным составляющим питательной среды может быть гидролизат растительного сырья либо любой другой источник углерода, используемый на данном заводе. Среду обогащают питательными солями и автолизатом дрожжей, который готовят в специальном аппарате — автолизаторе *6*. Сульфат аммония вводится в среду в количестве 5,6% (в пересчете на азот), водная вытяжка суперфосфата — 3,1% (по P_2O_5), хлористый кальций — 1,5%. Состав и количество солевых добавок могут меняться в зависимости от состава используемого сырья. Для максимального удаления токсических примесей среду, приготовленную на гидролизатах и щелоках, интенсивно аэрируют около 2—2,5 ч, затем оставляют в этом же аппарате для отстаивания и охлаждения на 6—7 ч либо, если на заводе имеет место инфицирование процесса посторонней микрофлорой, сразу после приготовления дополнительно стерилизуют в греющей колонке *9* и выдерживателе *10* и только после охлаждения в теплообменнике *11* насосом *12* перекачивают в отстойник *13*. Общая длительность приготовления питательной среды около 10 ч, поэтому для обеспечения непрерывности работы цеха приготовления посевного материала устанавливают 2—3 реактора.

Необходимость такой специальной линии приготовления питательной среды для посевного материала имеет место только на тех заво-

дах, где в промышленных ферментаторах в качестве среды используют послеспиртовую барду. Если же завод получает белковые препараты на гидролизатах или сульфитных щелоках, то среда для выращивания посевного материала отбирается из основного производства, а в цехе чистой культуры только стерилизуется и отстаивается.

На второй стадии выращивания посевного материала подготовленная питательная среда и дрожжевая разводка поступают в малый посевной аппарат *15* объемом 0,5 м³. Плотность начального засева сравнительно невелика (0,01% в пересчете на сухую массу дрожжей). Первоначально в посевной аппарат подают около 40 л питательной среды с содержанием редуцирующих веществ 2,0—2,6% и разбавляют ее в 4—4,5 раза стерильной водой так, чтобы содержание РВ не превышало 0,45—0,5%. Интенсивно аэрируя среду, постепенно добавляют остальное количество питательного раствора (70—90 л) со скоростью 7—8 л/ч, при этом pH поддерживается на уровне 4,0—5,5 добавлением аммиачной воды.

Культивирование продолжают до тех пор, пока в среде не накопится дрожжей 3,5—4,0 г/л (на сухую массу), т. е. количество их по сравнению с первоначальным засевом не возрастет в 35—40 раз. Обычно процесс заканчивается за 12—15 ч.

Третья стадия культивирования посевного материала осуществляется в посевных аппаратах *16* объемом от 4 до 5 м³. В них также первоначально вводится питательная среда (около 180—200 л), она разбавляется в 6,0—6,5 раза стерильной водой, и задаются все дрожжи вместе с жидкой фазой, полученные на второй стадии в малом посевном аппарате (около 300 л). Вся эта масса активно аэрируется в течение 10—12 ч при одновременном доливе питательной среды из расчета 70—75 л/ч и добавлении аммиачной воды для поддержания определенного значения pH.

Четвертая стадия процесса осуществляется в малом ферментаторе *17* объемом 12—15 м³. Аппарат на 10% заполняется стерильной или прокипяченной водой, туда же вводится около 0,5 м³ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое большого посевного аппарата (2,5—2,7 м³). Плотность первоначального засева на этой стадии процесса определяется по отношению к сумме редуцирующих веществ: она долж-

на быть около 10—12%. Выращивание посевного материала продолжается 8—9 ч при постоянном доливе питательной среды из расчета в среднем за цикл около 1,5—1,7 м³. Дрожжей в среде к концу цикла должно содержаться 4—5 г/л (по сухой массе), после чего начинают отбирать их в основное производство по 1,0—1,5 м³/ч, добавляя одновременно свежую питательную среду с содержанием РВ 1,0—1,2%. Процесс длится от 5 до 10 сут, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется.

В начале каждого цикла в заводской микробиологической лаборатории отбирают варианты культуры дрожжей, которые дали наилучшие результаты в основном производстве, т. е. тех, которые быстрее росли и накапливали наибольшее количество белка в клетках.

Если предприятие имеет очень большую производительность и объем посевного материала в 1,0—1,5 м³/ч недостаточен, в схему приготовления посевного материала вводится **пятая стадия**, т. е. еще один ферментатор *18*, в 4—6 раз больший по объему ферментатора четвертой ступени. В этом случае четвертая стадия процесса осуществляется так же, как третья, а пятый аппарат работает по режиму четвертой стадии с отбором готовых дрожжей до 6—7 м³/ч. Введение пятой стадии не вносит принципиальных изменений в технологическую схему процесса приготовления посевного материала, ее задача сводится лишь к увеличению объема отбираемого в производство посевного материала.

Выращивание микробных масс в промышленных ферментаторах

Ферментатор — это реакционная емкость, в которой при определенных условиях (давление, температура, концентрация сухих веществ, pH среды и т. д.) находится суспензия микроорганизмов. Основное назначение ферментатора — своевременно обеспечить микробную клетку необходимыми питательными веществами и кислородом и отвести продукты обмена веществ, создать гомогенный состав среды при условии слабой турбулентности потока. Для поддержания кислородного режима ферментатор снабжается устройством подвода воздуха, для лучшего перемешивания среды — мешал-

ками различной конструкции. Для отвода избыточного количества тепла (в процессе роста микроорганизма выделяется 10—14 кДж тепла на 1 кг сухой массы дрожжей) и поддержания температуры среды на оптимальном уровне в ферментаторах предусмотрены различные системы охлаждения: змеевики, уложенные вдоль стен внутри аппарата, выносные теплообменники и др.

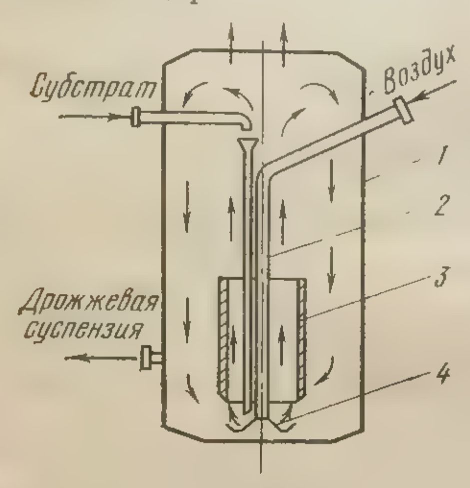


Рис. 21. Ферментатор системы Лефрансуа — Марийне:

1 — корпус аппарата; 2 — воздуховод; 3 — диффузор; 4 — кювета.

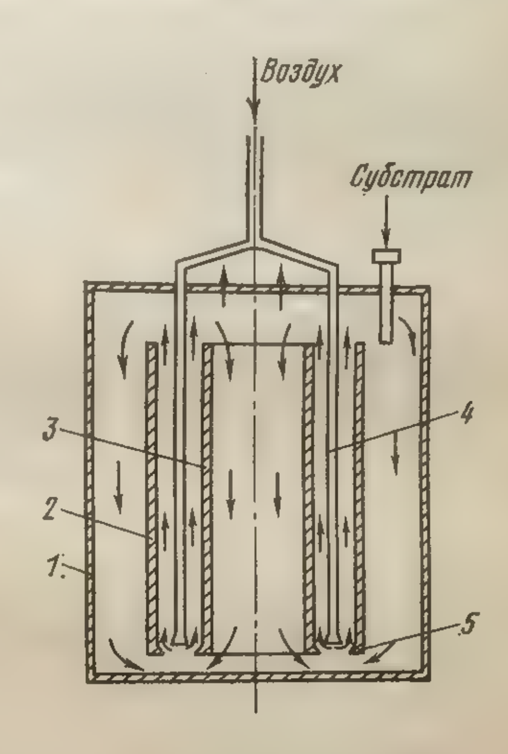


Рис. 22. Ферментатор с рассредоточенным воздухораспределением:

1 — корпус аппарата; 2 — внешний и 3 — внутренний диффузоры; 4 — воздуховод; 5 — распределительная воронка.

Конструкции ферментаторов отличаются большим разнообразием в зависимости от используемого сырья, а также систем подачи воздуха, перемешивания и отвода тепла. При правильном выборе конструкции с учетом удовлетворения потребностей микроорганизма можно добиться максимального выхода продукции при минимальных затратах энергии.

Для выращивания микроорганизмов на *жидких водорастворимых субстратах* используются несложные по конструкции ферментаторы.

Ферментатор системы Лефрансуа—Марийне. В этом аппарате (рис. 21) отсутствуют приспособления для механического перемешивания и пеногашения. Перемеши-

вание жидкости производится воздухом по типу эрлифтных насосов. В нижней части аппарата установлен центральный стакан (диффузор) *3*. Воздух подается через воздуховод *2*, проходящий через центр диффузора. Укрепленные на воздуховоде кювета *4* и конус на диффузоре направляют поток жидкости с диспергированным воздухом вверх по диффузору. Часть воздуха отделяется от потока жидкости и отводится сверху в атмосферу, а часть вместе с пеной поступает в низ аппарата через кольцевое пространство, образуемое стенками диффузора. При этом пена гасится и сжижается.

Отвод тепла осуществляется путем орошения наружной стенки, а также подачи охлаждающей воды между стенками диффузора. Недостатком конструкции является высокий расход воздуха (на 1 кг дрожжей необходимо 18—20 м^3 воздуха).

Ферментатор с рассредоточенным воздухораспределением. Внутри такого аппарата (рис. 22) устанавливаются два диффузора *2* и *3*, представляющие собой вертикальные трубы, вваренные своими концами в два кольцевых коллектора, разделенных на секции. В пространстве между диффузорами находится воздухораспределительная система, состоящая из воздуховодов *4* с распределительными воронками *5*. Воздух, выходя из воронок, диспергируется и смешивается с питательной средой. Образовавшаяся газожидкостная смесь поднимается по кольцевому пространству, образованному двумя диффузорами. Часть воздуха удаляется из аппарата сверху, а часть вместе с жидкостью спускается по кольцевому пространству между внешним диффузором и стенками аппарата, а также внутри центрального диффузора. Такая циркуляция суспензии микроорганизмов обеспечивает насыщение жидкости воздухом и снабжение клеток кислородом. Отвод тепла осуществляется с помощью охлаждающей воды, которая поступает в блоки периферийного и центрального диффузоров из нижнего наружного коллектора и выводится через верхний наружный коллектор.

Ферментатор с самовсасывающей системой аэрации. Аппараты этого типа имеют самовсасывающую турбину, создающую разрежение, благодаря которому через полый вал из верхней части аппарата или снаружи засасывается воздух. Самовсасывающий аэратор одновремен-

но перемешивает жидкость. Наиболее старым и хорошо известным аппаратом этого типа является ферментатор системы Вальдгофа (рис. 23), представляющий собой цилиндрический сосуд, в центре которого расположен полый вал (воздуховод), заканчивающийся на нижнем конце воздухораспределителем, выполненным в форме сегнерова колеса. Воздух в аппарат засасывается сверху, проходит через полый вал и далее по трубам в жидкость. Вал вращается вместе с сегнеровым колесом с частотой 320 об/мин, что обеспечивает сравнительно тонкое распределение воздуха. Для лучшей циркуляции воздуха в нижней части аппарата на расстоянии 600 мм от дна установлен направляющий цилиндр (диффузор). Отбрасываемая при вращении колеса воздухом жидкость по внешнему кольцу между стенками аппарата и диффузором поднимается, а затем опускается по внутренней полости цилиндра. Подобная система обеспечивает оптимальные условия контакта воздуха с жидкостью (а следовательно, с каждой дрожжевой клеткой)и предупреждает повышенное пенообразование. Тепло, выделяемое дрожжами в процессе роста, отводится при помощи холодной воды, пропускаемой через змеевик, который установлен внутри чана на $^1/_3$ его высоты. Основным недостатком данной конструкции является низкий коэффициент заполнения (22—25%).

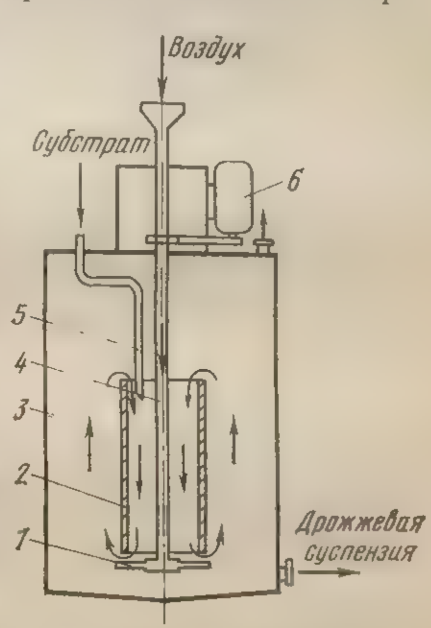


Рис. 23. Ферментатор с самовсасывающей системой аэрации:

1 — полые лопасти самовсасывающего аэратора; *2* — диффузор; *3* — корпус аппарата; *4* — воздуховод; *5* — труба подачи субстрата; *6* — привод мешалки.

Ферментаторы колонного типа. Аппараты этого типа бывают тарельчатыми (секционными) и колонными (башенными) без горизонтальных секционирующих устройств. Отношение высоты к диаметру в аппаратах подобного типа может быть равным 6 или больше.

Принцип работы б е с с е к ц и о н н о г о к о л о н н о г о

аппарата заключается в непрерывной циркуляции среды за счет разности плотностей аэрированной и дегазированной жидкостей. Аэрированная из барботера среда движется вверх, где происходит ее частичная дегазация. Отработанный газ с повышенным содержанием CO_2 выходит из аппарата, а питательная среда с малым газосодержанием поступает вниз.

Рис. 24. Струйный ферментатор:

1 — циркуляционный насос; *2* — корпус аппарата; *3* — секция; *4* — сливные патрубки; *5* — газоотводная труба; *6* — патрубок для сброса газа.

Примером секционного колонного аппарата может служить струйный ферментатор (рис. 24), запатентованный в ГДР, опытная модель которого испытана во ВНИИсинтезбелок. В основном корпусе колонны одна над другой расположены секции, соединенные сливными трубами. Жидкость насосами подается в верхнюю секцию колонны, из которой по системе сливных труб движется вниз, при этом струя жидкости за счет разрежения захватывает воздух, поступающий через газоотводную трубу. Воздух вместе со стекающей жидкостью поступает в нижнюю секцию. Объем ферментатора этой конструкции может достигать 1500—2000 м³.

Широкое распространение в последние годы получили колонные ферментаторы, секционированные по высоте тарелками различной конструкции. На рис. 25 представлен такой аппарат с выносным теплообменником. Аппарат включает емкость для выращивания микроорганизмов (ферментатор) и удлиненный трубопровод *1*, связанный с ферментатором. Культуральная жидкость перекачивается насосом *5* из ферментатора через трубопровод снова в ферментатор. При протекании жидкости по трубопроводу через нее пропускается кислород. Рубашка на трубопроводе обеспечивает отвод тепла, выделяемого в процессе ферментации. Аппарат соединяется с емкостью для сбо-

ра пены и увлекаемых с пеной продуктов ферментации. Концентрация клеток в культуральной жидкости составляет 3%, в жидкости из пены — 6%. Отношение объемов жидкости и газа в трубопроводе составляет 1 : 1. Скорость течения жидкости около 5 м/с, температура культивирования 40° С.

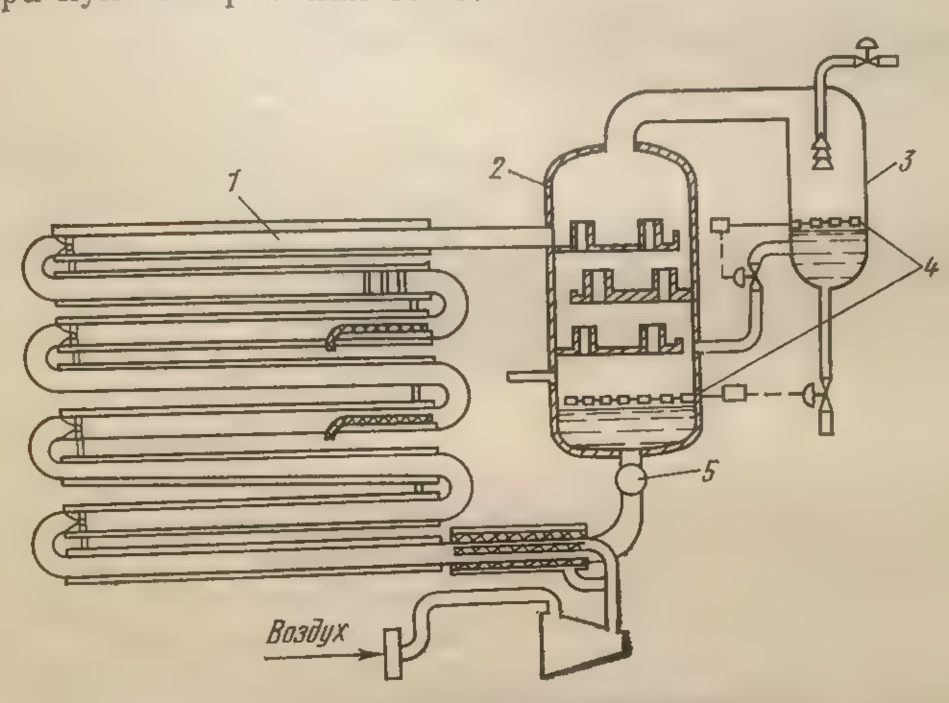
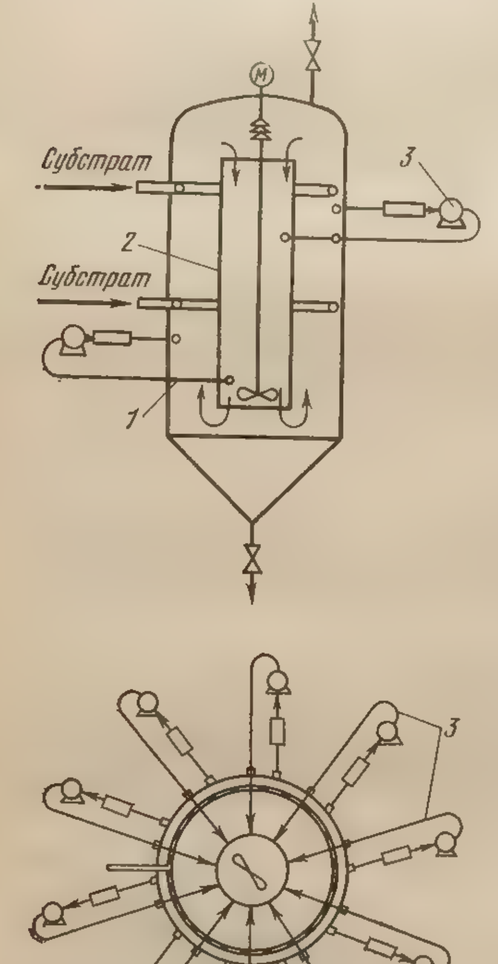


Рис. 25. Ферментатор с выносным теплообменником:
1 — трубопровод-теплообменник; 2 — корпус аппарата; 3 — емкость для улавливания пены; 4 — поплавковые регуляторы уровня жидкости; 5 — насос.

Ферментатор с внешними циркуляционными потоками. Данный аппарат (рис. 26) имеет внутреннюю циркуляционную трубу, в нижней части которой расположена пропеллерная мешалка, обеспечивающая циркуляцию культуральной жидкости внутри ферментатора. Трубопроводы с внешней стороны ферментатора, расположенные на разных уровнях по высоте, служат для порционной подачи питательной среды и отвода культуральной жидкости. Для поддержания оптимальных условий культивирования в каждом трубопроводе обеспечены теплообмен, перемешивание среды и введение воздуха. Каждый внешний циркуляционный контур отбирает порцию культуральной жидкости из кольцевого пространства аппарата между циркуляционной трубой и внешними стенками и передает ее во внутреннее пространство циркуляционной трубы. Системы трубопрово-

дов расположены по всей окружности ферментатора радиально. В каждом из вертикальных уровней насчитывается до 10 циркуляционных контуров.

Для выращивания микроорганизмов на **двух или более несмешивающихся жидкостях** используются аппараты, обеспечивающие хорошее смешение компонентов субстрата и воздуха.



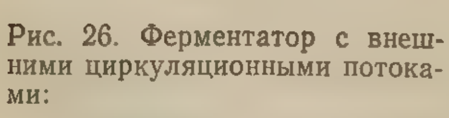


Рис. 26. Ферментатор с внешними циркуляционными потоками:

1 — корпус аппарата; *2* — внутренняя циркуляционная труба; *3* — трубопровод порционной подачи питательной среды.

Ферментатор с форсуночным воздухораспределением. В днище такого аппарата вместо барботеров вмонтированы форсунки для подачи сжатого воздуха. Выходя из форсунки, воздух диспергируется в среде, вследствие чего образуется воздушно-жидкостная эмульсия, плотность которой меньше плотности культуральной жидкости. За счет разности плотностей эмульсия движется вверх, а у форсунок создается разрежение, обеспечивающее подсос к отверстиям форсунок свежих порций среды.

Современные системы этих типов аппаратов имеют разбрызгивающие устройства для воздуха и питательной среды (рис. 27). Жидкость из форсунок должна выходить со скоростью от 10 до 100 м/с. Форсунки монтируются в плоскости дна ферментатора. Форсунки выполняют *2* функции: дробление газовой смеси и питательной среды для создания необходимой поверхности раздела фаз и образование внутренних концентрических направляющих потоков. Для

интенсификации круговых потоков смеси жидкость — газ вблизи от форсунок для двух веществ в определенном порядке, например в центре, устанавливаются форсунки с одним веществом. По этому способу можно диспергировать газы в форсунках для двух веществ, в то время как с помощью форсунки для одного вещества можно лишь увеличить скорость круговорота.

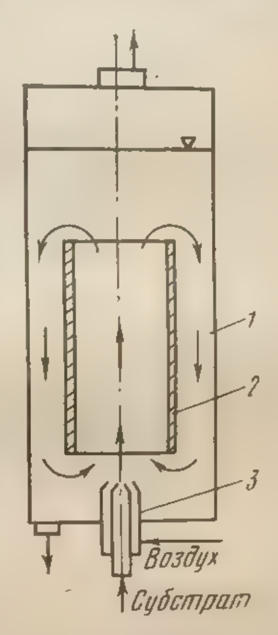
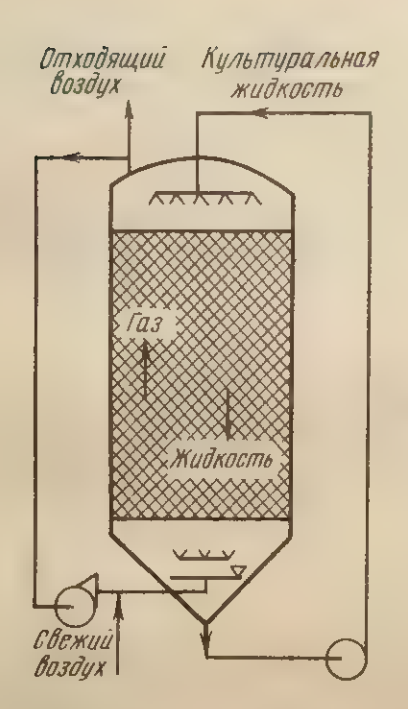


Рис. 27. Ферментатор с форсуночным воздухораспределением:

1 — корпус аппарата; *2* — диффузор; *3* — форсунка.

Ферментатор со струящейся пленкой. Аппарат (рис. 28) состоит из цилиндрического сосуда, заполненного вертикальными трубками (насадками), обеспечивающими круговорот жидкости и газа. Культуральная жидкость или исходная питательная среда (*н*-парафины) подаются сверху и в виде тонкой пленки спускаются по вертикальным каналам. За счет падения скорости, перпендикулярной направлению потока, клетки вовлекаются в дополнительное вращательное движение, обеспечивающее постоянный подвод к клетке свежих питательных веществ. Площадь поверхности пленки на 1 м³ объема резервуара с насадкой составляет 250 м², а на 1 м³ жидкости — 1250 м². Поверхность обмена в процессе культивирования остается приблизительно постоянной, а скорость насыщения кислородом регулируется количеством воздуха, подаваемого под небольшим избыточным давлением. Возможна замена воздуха чистым кислородом.

Ферментатор с добавками гранулата. Питательная жидкость в такой ферментатор (рис. 29) подается снизу, снизу же через круговой (в виде душа) барботер под давлением, создаваемым насосом, подается воздух, который увлекает за собой жидкость и частицы гранулата. Пузырьки газа, сталкиваясь с твердыми частицами гранулата, взвешенными в жидкости, разрушаются, в результате чего в этих микрообластях наблюдается падение скорости течения жидкости, а содержащиеся в



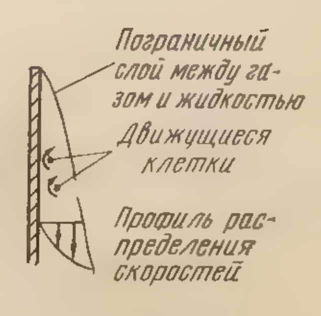


Рис. 28. Ферментатор со струящейся пленкой.

них микроорганизмы постоянно вступают в контакт со свежим питательным раствором.

Гранулат должен удовлетворять следующим требованиям: плотность более 1000 кг/м³; химическая инертность; отсутствие вредного воздействия на физиологические свойства микроорганизма; стойкость к стерилизации при 140° С и более; ударостойкость. Размер частиц выбирается в зависимости от свойств культуральной жидкости.

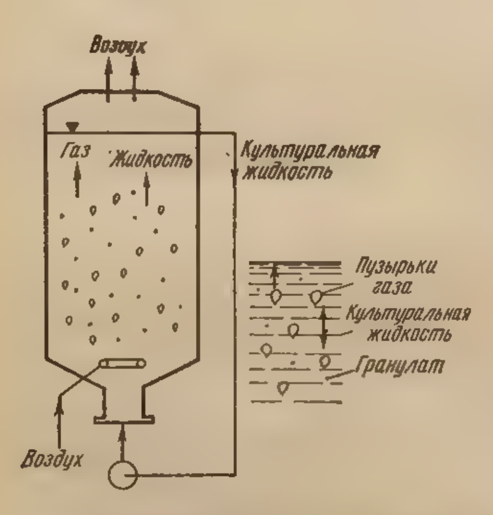


Рис. 29. Ферментатор с добавками гранулата.

В ферментаторах с добавками гранулата накапливается больше биомассы микроорганизмов, чем в ферментаторах без добавок (рис. 30).

Ферментатор с турбоэжекторными перемешивающими устройствами. Такой аппарат состоит из 12 секций с турбоэжекторами, расположенными по кольцу и об-

разующими сектор выращивания (секции 1—9) и сектор дозревания (секции 10—12). Одна секция такого аппарата показана на рис. 31.

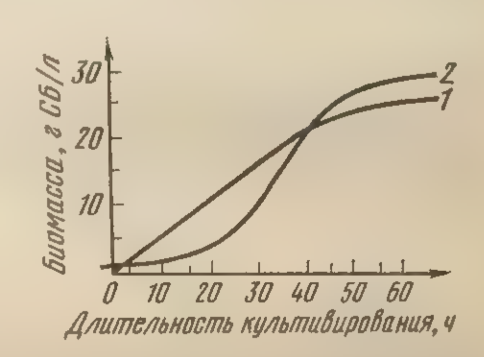


Рис. 30. Накопление биомассы в процессе культивирования микроорганизмов на *н*-парафинах в ферментаторах:

1 — без добавок гранулата; *2* — с добавками гранулата.

Турбоэжектор представляет собой сдвоенную самовсасывающую конструкцию с нижней и верхней горловинами для входа и выхода жидкости. Воздух, засасываемый из атмосферы, по трубопроводу поступает в турбоэжектор, где смешивается с жидкостью. Жидкость из турбоэжектора движется вверх, проходит через теплообменные устройства змеевикового типа (на рисунке не показаны) и далее разделяется на 2 потока: один поток направляется в центральную часть циркуляционного устройства (оно выполнено в виде вертикальных и горизонтальных перегородок) и входит в верхнюю горловину турбоэжектора, а второй поток опускается по периферии циркуляционного устройства и, проходя под ложным днищем, входит в нижнюю горловину турбоэжектора.

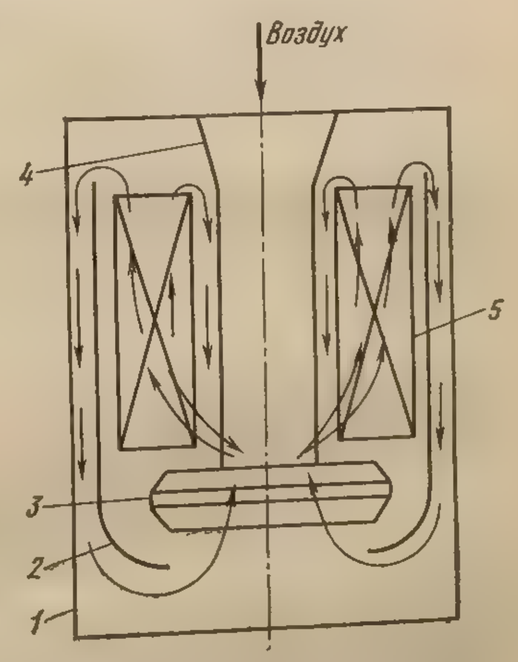


Рис. 31. Ферментатор с турбоэжекторными перемешивающими устройствами:

1 — корпус аппарата; *2* — ложное днище; *3* — турбоэжектор; *4* — трубопровод подачи воздуха; *5* — внутренние перегородки для создания циркуляционных потоков.

Для отвода тепла, выделяемого в процессе роста микроорганизмов, по периферии аппарата установлено 24 теплообменника, у внутренней стенки аппарата — 12.

Для выращивания микроорганизмов на газообразных углеводородах используются аппараты с механическим перемешиванием среды.

Ферментатор барботажного типа с мешалкой. Ферментатор (рис. 32) представляет собой реактор, снабженный мешалкой *9* и барботерами.

Газообразный углеводород поступает в аппарат через клапан *8*. После смешивания в определенном соотношении с рециркулируемым газом газообразный углеводород газодувкой *11* подается в ферментатор через блоки улавливания CO_2 *12* и барботер-гребенку *10*. Подача его контролируется с помощью газоанализатора *6*, определяющего концентрацию углеводорода на выходе.

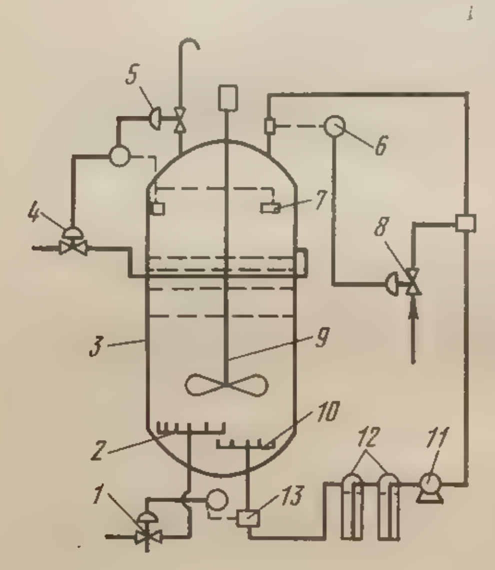


Рис. 32. Ферментатор барботажного типа с мешалкой:

1 — регулирующий клапан; *2* — барботер для подачи кислородсодержащего газа; *3* — корпус аппарата; *4* — регулятор давления газа в аппарате; *5* — клапан выпуска газа; *6* — газоанализатор (на выходе); *7* — анализатор; *8* — клапан; *9* — мешалка; *10* — барботер для подачи газообразного углеводорода; *11* — насос; *12* — блоки улавливания CO_2; *13* — газоанализатор (на входе).

Кислородсодержащий газ поступает в аппарат через регулирующий клапан *1* и барботер-гребенку *2*. Подача его регулируется с помощью газоанализатора *13*, определяющего концентрацию газообразного углеводорода на входе в аппарат. Концентрация компонентов в газовой фазе в верхней части ферментатора определяется с помощью анализаторов *7*.

Подача газов в ферментатор начинается с продувки азотом, после чего подается газообразный углеводород и кислородсодержащий газ. Для поддержания условий взрывобезопасности процесса осуществляется (в случае необходимости) разбавление газа азотом.

Другая схема микробиологической переработки газообразных углеводородов основана на противоточном прохождении газо-воздушной (или газо-кислородной) смеси через культуральную жидкость. При этом ферментация осуществляется в нескольких последовательно соединенных аппаратах, работающих под давлением.

§ 3. ОТДЕЛЕНИЕ БИОМАССЫ ПРОДУЦЕНТА ОТ ЖИДКОЙ ФАЗЫ, ЕЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ И СУШКА

Микробная биомасса во влажном состоянии храниться и транспортироваться не может. Она быстро теряет ценные биологически активные вещества и под действием собственных ферментных систем начинает разлагаться. Поэтому для придания клеточной биомассе товарного вида и стабильности при хранении и транспортировке ее обезвоживают. Культуральная жидкость, поступающая на стадию извлечения биомассы, обычно имеет от 5 до 10 г сухой биомассы (СБ) на 1 л жидкости. Это очень низкое содержание целевого продукта, и потому необходимо применять многоступенчатое сгущение клеточной биомассы, чтобы высушить ее до требуемой влажности.

Существует несколько способов извлечения клеточной биомассы микроорганизмов из готовой культуральной жидкости: отстаивание, фильтрование, сепарирование, центрифугирование и т. д. (механические способы), выпаривание и сушка (теплотехнические). При производстве кормового белка используют различные сочетания таких способов для концентрирования клеточной биомассы (например, флотирование, сепарирование, выпаривание и сушка), но всегда при выборе определенной схемы концентрирования и извлечения биомассы проводят ее экономическое обоснование.

Выбор той или другой схемы, кроме того, зависит от используемого продуцента (дрожжи, микроскопические грибы, бактерии), концентрации микроорганизма в культуральной жидкости, концентрации и природы используемого субстрата и др.

Флотирование

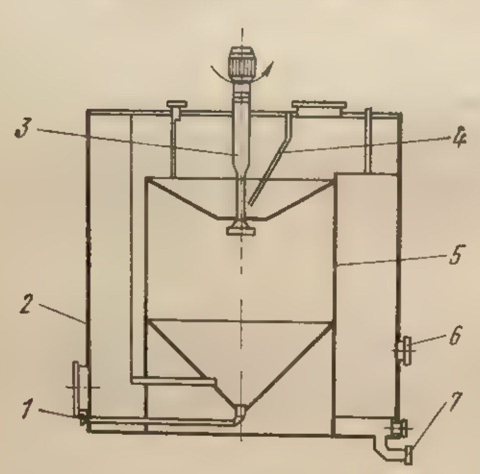
Этот способ применим только для выделения дрожжей. При производстве кормовых дрожжей процесс флотирования дрожжевых клеток осуществляется путем вспенивания готовой культуральной жидкости. Вместе с пеной из культуральной жидкости удаляется основная масса дрожжей.

Природа процесса флотирования дрожжей пока до конца не изучена. Есть предположение, что переходу дрожжей в пену способствуют поверхностно-активные вещества, присутствующие в культуральной жидкости, которые сорбируются на поверхности раздела фаз воздух—

жидкость. А дрожжевые клетки, имеющие сродство к поверхностно-активным веществам и электрический заряд, адсорбируются за счет возникновения полярных связей на поверхности раздела фаз воздух — жидкость. Другое предположение связывает флотационную способность дрожжей с содержанием в клетках свободной и связанной воды, а также присутствием в среде ионов кальция. В условиях интенсивной аэрации клетки теряют гидратную оболочку, попадают на границу раздела жидкой и газовой фаз и поднимаются на поверхность.

Флотирование дрожжей производится в специальных аппаратах — флотаторах различных конструкций, позволяющих в 2—4 раза увеличить концентрацию дрожжевой биомассы.

Одноступенчатый флотатор. На рис. 33 представлен общий вид флотатора производительностью 100 м³/ч. Флотатор состоит из стального цилиндрической формы корпуса *2* с плоским днищем, внутри которого установлен стакан *5* меньшего диаметра. Пространство между стенками корпуса и стакана разделено вертикальными перегородками на секции (от двух до шести). Перегородка между первой и последней секциями сплошная, доходит до дна, между остальными секциями перегородки до дна не доходят. В нижней части флотатора в секциях смонтированы барботеры, в верхней части — механический пеногаситель, приводимый от электродвигателя. Для улучшения пеногашения на вращающийся диск пеногасителя по трубе *4* подается вода. Для возможности использования химического пеногасителя в верхней части корпуса имеется специальная емкость.



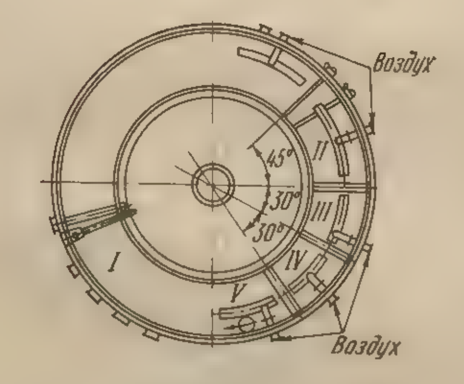


Рис. 33. Одноступенчатый флотатор:

1 — штуцер для выхода сгущенной дрожжевой суспензии; *2* — стальной корпус; *3* — механический пеногаситель; *4* — труба подачи воды на крыльчатку пеногасителя; *5* — внутренний стакан; *6* — штуцер для ввода дрожжевой суспензии; *7* — штуцер для выхода отфлотированной жидкости; *I—V* — секции.

Дрожжевая суспензия из дрожжерастильного аппарата поступает в первую, самую большую по длине секцию флотатора через штуцер *6*. За счет воздуха, подаваемого через барботер, в этой секции происходит флотирование основной массы дрожжей. Образующаяся пена стекает через верхний борт внутреннего цилиндра (стакана) и по усеченному конусу попадает в зону пеногашения. Нефлотированная жидкость перетекает из секции в секцию под вертикальными перегородками, освобождается от дрожжей и к последней секции приходит с минимальным их содержанием. Собранная во внутреннем стакане флотатора сгущенная дрожжевая суспензия отводится по трубопроводу через штуцер *1* на сепараторы для дальнейшего концентрирования. Освобожденная от дрожжей жидкость через штуцер *7* по трубе направляется либо для вторичного использования или упаривания, либо после предварительной очистки сбрасывается в канализацию. Потери дрожжей составляют 5—7%.

Двухступенчатый флотатор. На рис. 34 представлен общий вид такого флотатора производительностью 100 м³/ч. Дрожжевая суспензия из дрожжерастильного чана поступает в кольцевое пространство флотатора, образуемое внешним цилиндрическим корпусом и внутренним стаканом (I ступень), и проходит последовательно все секции. Освобожденная

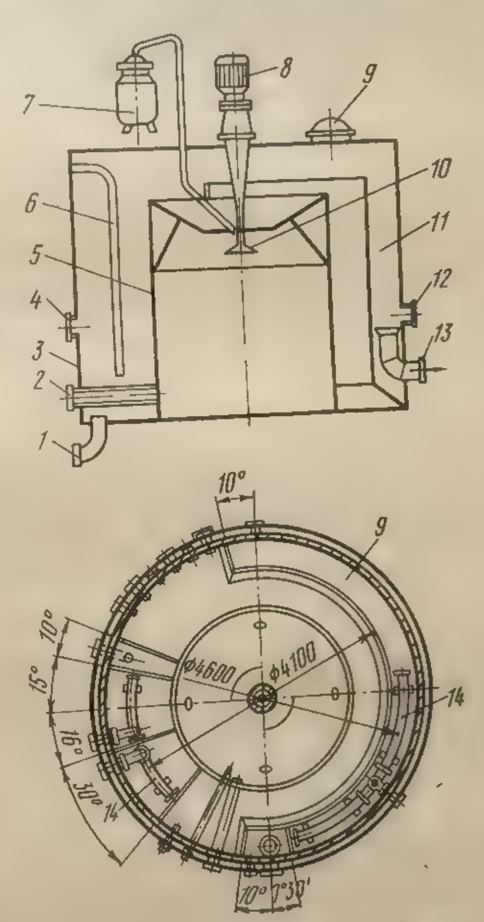


Рис. 34. Двухступенчатый флотатор:

1 — патрубок выхода отработанной жидкости с I ступени; *2* — сгущенная дрожжевая суспензия; *3* — стальной корпус; *4* — штуцер для ввода дрожжевой суспензии; *5* — внутренний стакан; *6* — патрубок ввода воздуха; *7* — бак для пеногасителя; *8* — электродвигатель; *9* — люк; *10* — крыльчатка пеногасителя; *11* — внутренний карман; *12* — патрубок входа жидкости на II ступень; *13* — патрубок отвода отработанной жидкости; *14* — барботер.

от дрожжей жидкость откачивается центробежным насосом во внутренний карман (II ступень). Подаваемый на II ступень воздух флотирует оставшиеся после первой ступени дрожжевые клетки.

Размещение в одном флотаторе двух ступеней флотирования обеспечивает компактность оборудования и позволяет достичь значительного сгущения суспензии дрожжей: на первой ступени в 2 раза (с 5—10 до 10—20 г СБ на 1 л), на второй ступени еще приблизительно в 2 раза (до 20—40 г СБ на 1 л).

Сепарирование

Дальнейшее сгущение биомассы микроорганизмов достигается сепарированием. Максимально на сепараторах можно сгустить биомассу до 130—150 г СБ на 1 л. Такой степени сгущения без предварительного флотирования можно достичь только в несколько ступеней.

В частности, при отделении дрожжей на сепараторе с одновременной их промывкой (разбавлением) необходимо иметь три ступени, при предварительном флотировании — только две. Кроме того, процесс сепарирования значительно более энергоемок по сравнению с флотированием, поэтому включение стадии флотирования позволяет заметно снизить затраты на выделение дрожжей.

Во всех случаях до поступления на сепаратор дрожжевая суспензия должна пройти деэмульгирование — ожижение, обеспечивающее нормальное перекачивание и сепарирование. Деэмульгирование пены осуществляется различными способами: механическим (механическое гашение пены во флотаторах или вне их, при отсутствии стадии флотирования — гашение пены дрожжевой суспензии, выходящей из дрожжерастильных аппаратов); естественным (в специальных деэмульгаторах, установленных последовательно на пути дрожжевой эмульсии из дрожжерастильного аппарата в приемник); химическим (с использованием химических средств пеногашения).

Отделение клеточной биомассы в сепараторах протекает подобно осаждению при отстаивании под влиянием силы тяжести. Однако помимо силы тяжести в сепараторах на дрожжевую клетку действует еще центробежная сила, которая во много раз превышает силу тяжести. Под влиянием центробежной силы дрожжевые клет-

ки, имеющие плотность до 1,1 г/см³, отбрасываются к периферии сосуда, а жидкость, лишенная дрожжей, как более легкая (плотность ее около 1 г/см³), будет собираться в центре сепаратора.

Скорость выделения дрожжей в сепараторах в 5000—6000 раз выше скорости осаждения дрожжей в отстойниках.

В настоящее время разрабатываются новые декантационные и флотационные методы выделения биомассы с применением поверхностно-активных веществ. В частности, дрожжи, выращенные на дизельном топливе, отделяют от жидкости декантацией, при этом они скапливаются в масляной фазе в виде суспензии. Суспензию обрабатывают каким-либо детергентом, например сложным эфиром сахарозы, семизолом, после чего дрожжи отделяют центрифугированием. Дрожжевые клетки отмывают для удаления детергента, который вновь вводится в процесс.

Для выделения бактериальной биомассы из культуральной жидкости предложено два бессепарационных метода. По первому из них суспензию, выходящую из ферментатора, подкисляют до pH 2,7—4,5. Подкисленную суспензию нагревают в интервале температур 45—90° С в течение 10—30 мин. В результате такой обработки происходит коагуляция микробной биомассы, и она легко отделяется от водной фазы любым из обычных методов разделения двухфазных систем: фильтрованием, декантацией, центрифугированием.

Для подкисления суспензии можно использовать кислоту или смесь кислоты с минеральной солью. Обязательным условием является наличие в кислоте и в соли питательных компонентов и отсутствие компонентов, вредных для микроорганизмов, так как водная среда после отделения биомассы возвращается в ферментатор на стадию выращивания. Для подкисления используются фосфорная, *о*-фосфорная, уксусная, пропионовая, масляная, метилфосфиновая, *о*-фосфиновая, *м*-фосфиновая, соляная, серная, азотная кислоты, фосфорная кислота+хлористый кальций, фосфорная кислота+хлористый натрий, фосфорная кислота+хлористый кальций+хлористый натрий, уксусная кислота+хлористый кальций.

Добиться коагуляции биомассы можно, добавляя в суспензию только хлористый кальций, притом в широком диапазоне концентраций (от 0,01 до 10,0% мас.) и при любом pH.

Не менее эффективным методом выделения микробной биомассы из культуральной жидкости является введение в нее органического растворителя, не смешивающегося с водой, теплота испарения которого значительно ниже, а плотность выше, чем у воды. В данной системе биомасса оказывается агломерированной в органическом слое и легко выделяется любым классическим методом. Особенно пригодными для реализации настоящего метода оказались галоидированные углеводороды C_1—C_5 (хлороформ, метиленхлорид, четыреххлористый углерод, метиленбромид, трихлорфторметан, дихлорфторметан, 1-бром-2-хлорэтан, 1,1-диброметан, 1,1-дихлорэтан, 1,2-дихлорэтан, 1,1-дихлорэтилен, 1,2-дихлорэтилен, пентахлорэтан, 1, 1, 1, 2-тетрабромэтан, 1, 1, 1, 2-тетрахлорэтан, этилбромид, 1, 2-дибромпропан, 1-хлорбутан, 2-бромбутан и др.), а также сероуглерод и толуол.

Условия, при которых проводят смешивание культуральной жидкости с органическим растворителем, следующие:

Температура, °С 20—55, преимущественно 35—45.

Соотношение растворителя и культуральной жидкости 1 : 2 — 100 : 1, преимущественно 1 : 10 — 10 : 1.

Продолжительность смешивания, мин 60, преимущественно 10—30.

Сушка

Для получения белковых препаратов, пригодных к длительному хранению и транспортировкам, отделенную от жидкой фазы биомассу продуцента сушат до влажности 8—10%.

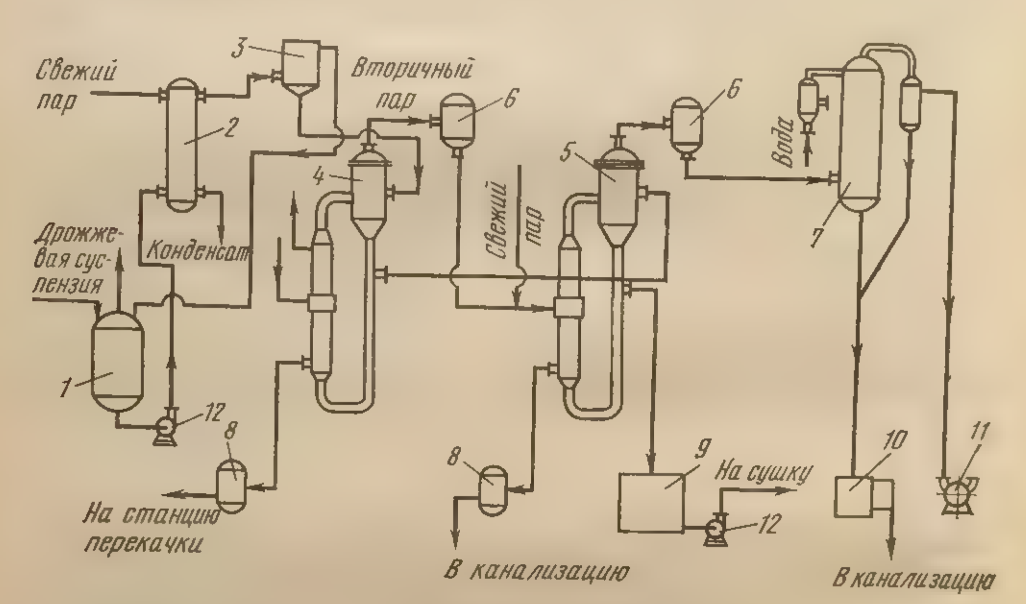
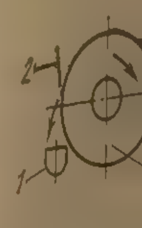


Рис. 35. Схема двухкорпусной вакуум-выпарной установки:

1 — сборник дрожжевой суспензии; *2* — подогреватель-плазмолизатор; *3* — напорный бак; *4*, *5* — вакуум-выпарные аппараты; *6* — брызгоотделитель; *7* — барометрический конденсатор; *8* — испаритель конденсата; *9* — сборник упаренной суспензии; *10* — сборник барометрической воды; *11* — вакуумный насос; *12* — насосы.

Для снижения расхода пара на сушку дрожжевую суспензию, полученную после сепарирования или флотирования, предварительно упаривают до содержания сухих веществ 24—26%. Процесс проводят на вакуум-выпарных установках (рис. 35) с соблюдением следующих условий:

для сохранения витаминного состава дрожжей температура выпаривания не должна превышать 80—85° С. Повышение температуры выше 85° С, кроме того, может



привести к пригоранию сухих веществ к поверхности кипятильных труб;

для снижения пенообразования дрожжевую суспензию перед подачей в выпарные аппараты необходимо плазмолизировать;

греющая камера выпарного аппарата должна обеспечить хорошую циркуляцию дрожжевой суспензии. В схеме выпарного аппарата должна быть предусмотрена непрерывная циркуляция дрожжевой суспензии по трубам

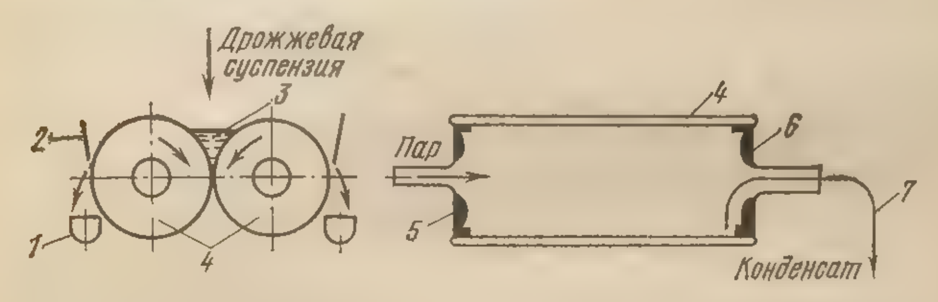


Рис. 36. Двухвальцовая паровая сушилка непогружного типа:

1 — продольный шнек; *2* — нож; *3* — клинья; *4* — барабан; *5*, *6* — крышки с полуосями; *7* — трубка для вывода конденсата.

и аппаратам без длительных остановок;

для снижения расхода тепла работу выпарного аппарата необходимо осуществлять по схеме с многократным его использованием;

схемы коммуникаций и конструкции выпарных аппаратов должны предусматривать химическую и механическую очистку всех теплопередающих поверхностей.

Для сушки концентрата клеточной суспензии применяются вальцовые и распылительные сушилки. На вальцовых сушилках, широко используемых на предприятиях малой мощности, потери белка достигают 15%. На распылительных сушилках потери белка значительно меньше.

Вальцовые сушилки. Процесс сушки в таких аппаратах происходит в результате соприкосновения материала (биомассы) с горячей поверхностью вращающегося барабана (внутрь барабана подается пар). По конструкции эти сушилки бывают одно- и двухвальцовые, непогружные и погружные. В производстве кормовых дрожжей чаще применяются двухвальцовые сушилки.

Двухвальцовая сушилка непогружного типа ВСГ (рис. 36) состоит из двух стальных, полых,

горизонтально расположенных барабанов диаметром 1220 и длиной 4000 мм. Каждый барабан закрыт с торцов крышками *5* и *6*. Барабаны устанавливаются строго параллельно в подшипниках на общей литой чугунной станине. Через полуоси, имеющие центральные отверстия, в барабаны с одной стороны поступает греющий пар давлением 0,3—0,4 МПа, с другой через специаль-

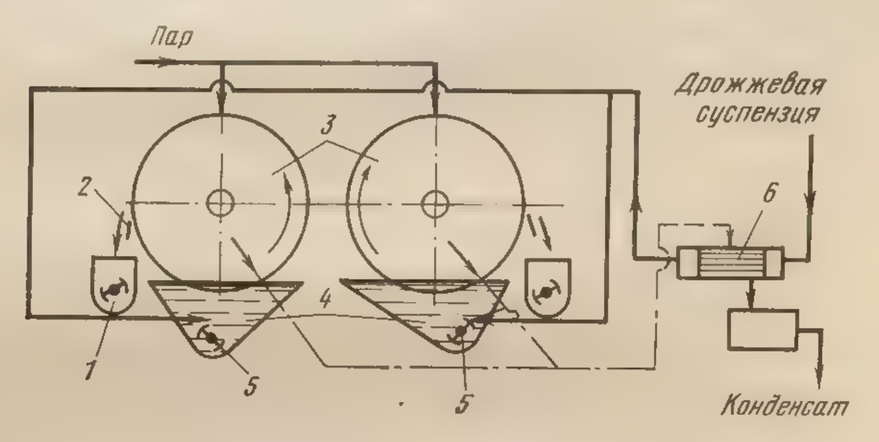


Рис. 37. Двухвальцовая паровая сушилка погружного типа:

1 — шнек; *2* — нож; *3* — барабан; *4* — ванна; *5* — мешалка; *6* — подогреватель.



ную трубку отводится конденсат. Сверху у торцов барабанов устанавливаются клинья *3*, образующие между барабанами ванну, в которую непрерывно поступает концентрат биомассы (с содержанием сухих веществ 12,5—25%). Находясь несколько минут в этой ванне, концентрат нагревается до температуры около 100° С, часть влаги при этом испаряется. Барабаны вращаются навстречу один другому, клеточная биомасса намазывается на их поверхность тонким ровным слоем и за $^2/_3$ оборота барабана пленка биомассы успевает высохнуть до влажности 8—10%. Сухая пленка снимается с поверхности барабанов ножами, укрепленными вместе с прижимными устройствами на горизонтальной траверсе, и осыпается в продольные шнеки *1*, а из них через систему транспортных средств поступает в мешки или бункер. На 1 кг испаряемой влаги расходуется 1,7 кг пара. Производительность двухвальцовой паровой сушилки ВСГ 1000 кг испаряемой влаги в час.

Двухвальцовая сушилка погружного типа СДА 1200/3600 (рис. 37) отличается от описанной

выше сушилки тем, что в ней каждый сушильный барабан, погруженный в ванну, работает самостоятельно. Производительность такой сушилки по испаряемой влаге и расход пара на 1 кг испаряемой влаги такие же, как у сушилки ВСГ. Эта сушилка дает возможность увеличить коэффициент использования рабочей поверхности барабанов и уменьшить контактирование отходящих паров влаги с высушенными дрожжами.

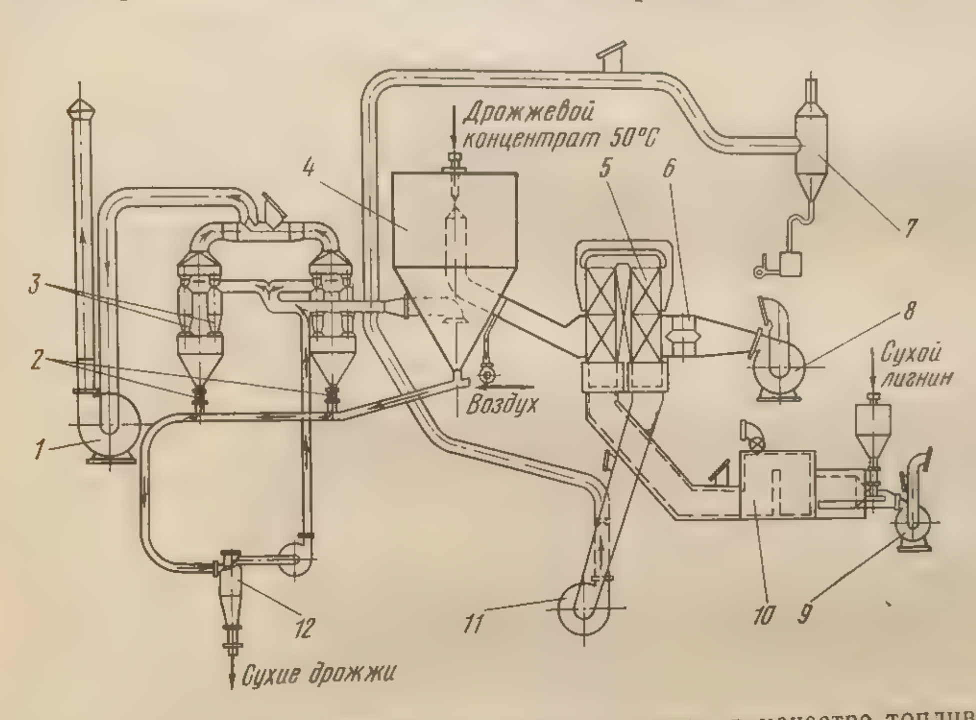


Рис. 38. Сушильная установка с использованием в качестве топлива лигнина:

1 — дымосос сушилки; *2* — секторный питатель; *3* — циклон; *4* — распылительная сушилка; *5* — трубчатый воздухоподогреватель; *6* — калорифер для подогрева воздуха; *7* — газоочиститель-циклон; *8* — вентилятор воздухоподогревателя; *9* — топочный вентилятор; *10* — циклонная топка для сжигания лигнина; *11* — дымосос; *12* — циклон для отделения сухих дрожжей.

Распылительные сушилки. Процесс сушки в распылительных сушилках основан на тонком распылении концентрата клеточной биомассы в камере, заполненной горячим воздухом. Мельчайшие капли концентрата в этих условиях быстро высыхают и в виде тонкого порошка падают на дно сушилки. В распылительных сушилках для нагрева сушильного агента используются различные виды топлива: газ, мазут и лигнин.

Сушильная установка с использованием в качестве топлива лигнина и с центробежным распылением концен-

трата клеточной суспензии (с содержанием сухих веществ 22—25%) показана на рис. 38. Концентрат насосом подается к центробежному распылительному диску сушилки *4* и распыляется в потоке сушильного агента, нагретого дымовыми газами до температуры 180—300° С в теплообменнике *5*. Предварительно подсушенный лигнин сжигается в печи *10* циклонного типа. Использованные дымовые газы очищаются в циклоне *7* и отводятся в атмосферу. Отработанный в сушильной камере воздух температурой 80—90° С отводится из сушильной камеры в циклон *3*, где от него отделяется готовый продукт. Через шлюзовые затворы *2* сухой порошок пневмотранспортом подается в циклон-разгрузитель *12*, где собирается готовый продукт из сушильной камеры.

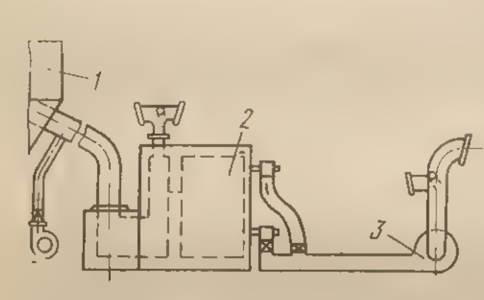


Рис. 39. Участок подготовки сушильного агента в установке для сушки дрожжей с использованием в качестве топлива природного газа:

1 — распылительная сушилка; *2* — топка для сжигания; *3* — топочный вентилятор.

При использовании в установке в качестве топлива природного газа участок отвода готового продукта остается тем же, а участок подготовки сушильного агента меняется (рис. 39).

Распылительные сушилки работают при следующих режимах:

Температура, °С	
поступающего на сушку концентрата биомассы	55
подаваемого воздуха	200—300
воздуха, отходящего из сушильной камеры	90
дымовых газов перед воздухоподогревателем	500
Расход лигнина (влажностью 40%, с теплотой сгорания 3250 кДж/кг) в пересчете на 1 т сухого продукта, т	1,1

Витаминизация микробной биомассы

Для повышения питательной ценности кормового белка его обогащают витаминами одним из следующих способов (или комплексно): в процессе выращивания; специальной обработкой готовой биомассы; путем добавки готовых витаминов в концентрат клеточной биомассы перед высушиванием.

Получение витаминов в процессе выращивания микроорганизмов. Витаминный состав микроорганизмов — продуцентов кормового белка — в большой степени зависит от рода и вида микроорганизма, состава питательной среды, интенсивности аэрации, условий упаривания и сушки. Для получения продукта, богатого витаминами, выбирают продуценты, способные накапливать в процессе культивирования значительные количества витаминов.

Обычно на производстве в аппаратах имеется смесь нескольких видов микроорганизмов, каждый из которых способен накапливать различные количества витаминов (табл. 6). Подбирая условия культивирования и состав питательной среды, можно получать готовый продукт с необходимым комплексом витаминов.

Таблица 6

Завод	Вид дрожжей	Условное обозначение дрожжей	Содержание витаминов в сухой биомассе, мкг/кг: тиамина	рибофлавина	никотиновой кислоты	фолиевой кислоты	%
Канский	Candida utilis	К-2	10,9	37,4	417	35,3	0,38
Лобвинский	Candida albicans	Л-2	15,3	63,5	402	16,5	0,44
Красноярский	Candida sp.	Кр-9	18,3	48,6	326	18,0	0,40
Хорский	Candida sp.	Х-9	12,1	54,6	405	7,5	0,24
Саратовский	Candida tropicalis	СД-5	17,4	47,1	411	18,0	0,41
Соликамский ЦБК	Candida utilis	С-1	5,6	25,9	415	26,4	0,48
Московский	Saccharomyces cerevisiae	ЛБД-11	28,4	28,5	157	15,5	1,24

Кормовые дрожжи содержат все витамины группы В, кроме витамина B_{12}.

Обогащение кормовых дрожжей витаминами путем специальной обработки. В дрожжах в значительных ко-

личествах присутствует эргостерин, который можно перевести в витамин D_2. Превращение эргостерина в витамин D_2 может происходить при облучении ультрафиолетовыми лучами дрожжей в сухом виде (порошок или гранулы), в виде суспензии или концентрата белковой биомассы.

При обработке сухих дрожжевых препаратов необходим тщательный контроль режима облучения, так как

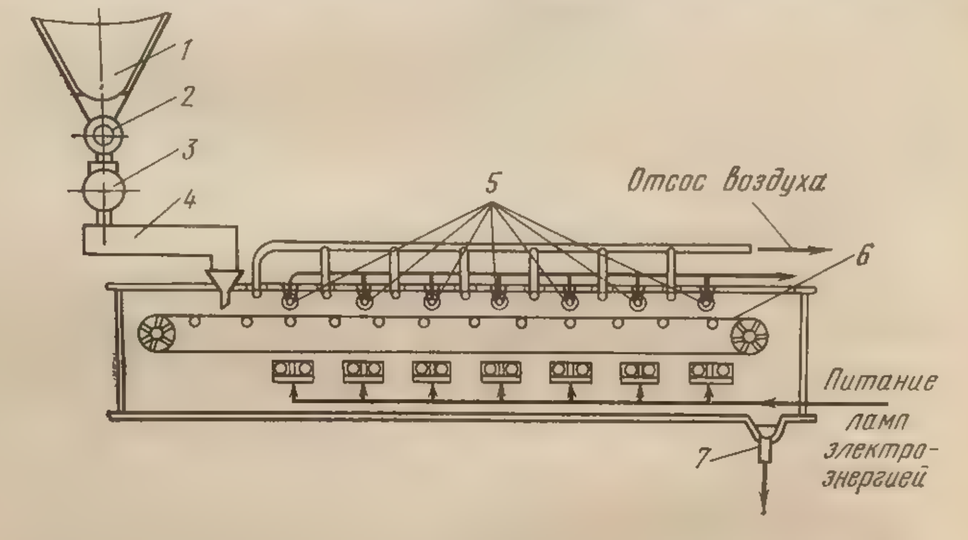


Рис. 40. Витаминизатор сухих дрожжей:

1 — бункер; *2* — дозатор; *3* — дисковая мельница; *4* — питатель; *5* — кварцевые лампы; *6* — ленточный транспортер; *7* — бункер для приема облученных дрожжей.

при слишком интенсивном воздействии ультрафиолетовых лучей белок частично разрушается, а в среде накапливаются вредные и ядовитые вещества.

Один из наиболее часто используемых витаминизаторов для обработки сухих дрожжевых препаратов приведен на рис. 40. Дрожжи с остаточной влажностью не более 5—6% из бункера *1* через дозатор *2* поступают в дисковую мельницу *3*, где происходит их измельчение до порошкообразного состояния. Из мельницы дрожжи питателем *4* насыпаются на непрерывно движущуюся ленту транспортера *6* слоем 1,0—1,5 мм. Снаружи ленточный транспортер закрыт металлическим коробом, в верхней части которого расположены кварцевые лампы *5*, имеющие форму трубок. При движении ленты находящиеся в тонком слое дрожжи облучаются прямыми УФ-лучами. Для равномерного облучения сухих дрож-

жей по всей поверхности их взрыхляют с помощью цепочек, перекинутых через ленту и свободно на ней лежащих. Облучение позволяет довести содержание витамина D_2 до 5000—6000 условных единиц.

Кормовые дрожжи в виде клеточной суспензии, полученной после сепараторов, облучают в специальных витаминизаторах прямым воздействием УФ-лучей или же через стенки стеклянных трубок, по которым циркулирует дрожжевая суспензия.

Прямое воздействие ультрафиолетовых лучей на дрожжи, находящиеся в дрожжевой суспензии, осуществляется в витаминизаторах каскадного (полочного) типа. В таких витаминизаторах дрожжевая суспензия из верхнего распределительного ящика тонким слоем стекает по расположенным в виде каскада полкам и подвергается облучению. Для увеличения содержания витамина суспензия по каскаду пропускается многократно.

В витаминизаторах непрямого воздействия для более полного облучения дрожжей требуется интенсивное перемешивание клеточной суспензии. При этом проникновение УФ-лучей в толщу облучаемой жидкости зависит от ее прозрачности: чем прозрачнее жидкость, тем эффективнее облучение. Сгущенные дрожжи облучаются медленнее.

Прохождению ультрафиолетовых лучей может препятствовать осадок дрожжей, отлагающийся на внутренних поверхностях трубок. С увеличением концентрации дрожжевой суспензии увеличивается объем осадка, поэтому необходимо подбирать оптимальную концентрацию дрожжевой суспензии и оптимальные режимы движения ее по трубкам. Образующийся осадок ежесменно смывают горячей водой.

Добавление готовых витаминов. Если в результате проведенных способов обогащения кормовые белковые препараты все же не содержат полного комплекса витаминов, необходимых для пищевого рациона животных и птиц, недостающие витамины добавляют на отдельных стадиях технологического процесса. Для этого витамины растворяют в чистой воде и в виде раствора дозировочным плунжерным насосом подают в поток, непосредственно в трубопровод для дрожжевого концентрата. Витамины B_1 и B_5 хорошо растворяются в воде в любых концентрациях, а витамин B_2—лишь при содержании его

0,125 г/л. Клетки микроорганизмов сорбируют на своей поверхности витамины из введенной в концентрат клеточной суспензии раствора, и в дальнейшем сухие кормовые препараты сохраняют в своем составе значительную часть витаминов. Чтобы не допустить разрушения витаминов, на последующих стадиях производства — выпарке и сушке — необходимо поддерживать строгий температурный режим. Как правило, большинство витаминов разлагается при температуре 90—100° С, поэтому упаривание суспензии клеточной биомассы следует проводить при температуре не выше 80—85°С.

Сушка белковых препаратов на распылительных сушилках проводится при температуре 200—300° С. Однако в связи с весьма кратковременным пребыванием частиц биомассы в сушильной камере основная масса витаминов сохраняется. Для окончательного определения влияния сушки и выпаривания на изменение витаминного состава дрожжей необходимо провести специальные исследования.

Фасовка, упаковка и складирование готового препарата

При выпуске сухих кормовых препаратов в виде порошка их фасуют по 25—30 кг в бумажные непропитанные мешки, клапанные или открытые, для удобства складирования и транспортировки на складе, в железнодорожных вагонах или в других транспортных средствах.

Гранулированные и брикетированные препараты могут храниться и транспортироваться как тарным, как и бестарным способами. Для крупных предприятий с объемом производства кормового белка до 200—300 т в сутки система упаковки продукта в мешки становится весьма громоздкой. В данном случае необходим переход на бестарное (бункерное) хранение дрожжей и отгрузку их в железнодорожных вагонах в неупакованном виде.

На фасовку в упаковочно-взвешивающие машины препарат из сушильного отделения в зависимости от взаимного расположения сушилки и приемного бункера подается шнековым транспортером либо ковшовым элеватором. На заводах большой производительности для транспортировки дрожжей применяют пневмотранспорт.

Приемный бункер представляет собой сварную конструкцию прямоугольного сечения, в нижней его части находятся 4 отверстия с шиберами, через которые с помощью подающих механизмов сухие препараты подаются на упаковочно-взвешивающие машины. В настоящее время такие машины для дрожжей производительностью до 2 т/ч марки ВРА выпускаются серийно.

Для фасовки препарата мешок клапанным отверстием надевают вручную на носок упаковочной машины. Машину включают, мешок заполняется дрожжами за 15—20 с, по достижении определенной массы мешка машина автоматически отключается. Для взвешивания применяются весы марки ДДР-50. Мешок снимают с носка для загрузки, слегка встряхивают, чтобы находящийся внутри мешка бумажный клапан закрыл клапанное отверстие. При фасовке препаратов в открытые мешки они после заполнения отправляются на ленточном транспортере на зашивочную машину. Этим же транспортером мешки передаются на склад для укладки в штабеля.

Для уменьшения количества погрузочно-разгрузочных операций на складе при массовом потоке бумажных мешков применяются поддоны. На поддон укладывают мешки в 5 рядов вперевязку. Такие штабеля на поддонах отвозят на склад автопогрузчиком. На складе поддоны со штабелями мешков укладывают в 2—3 ряда по высоте, оставляя проезды для маневрирования погрузчика. При такой укладке мешков на 1 м² полезной складской площади можно уложить до 1 т дрожжей. Склад обычно рассчитывают на 5-суточную выработку готового продукта.

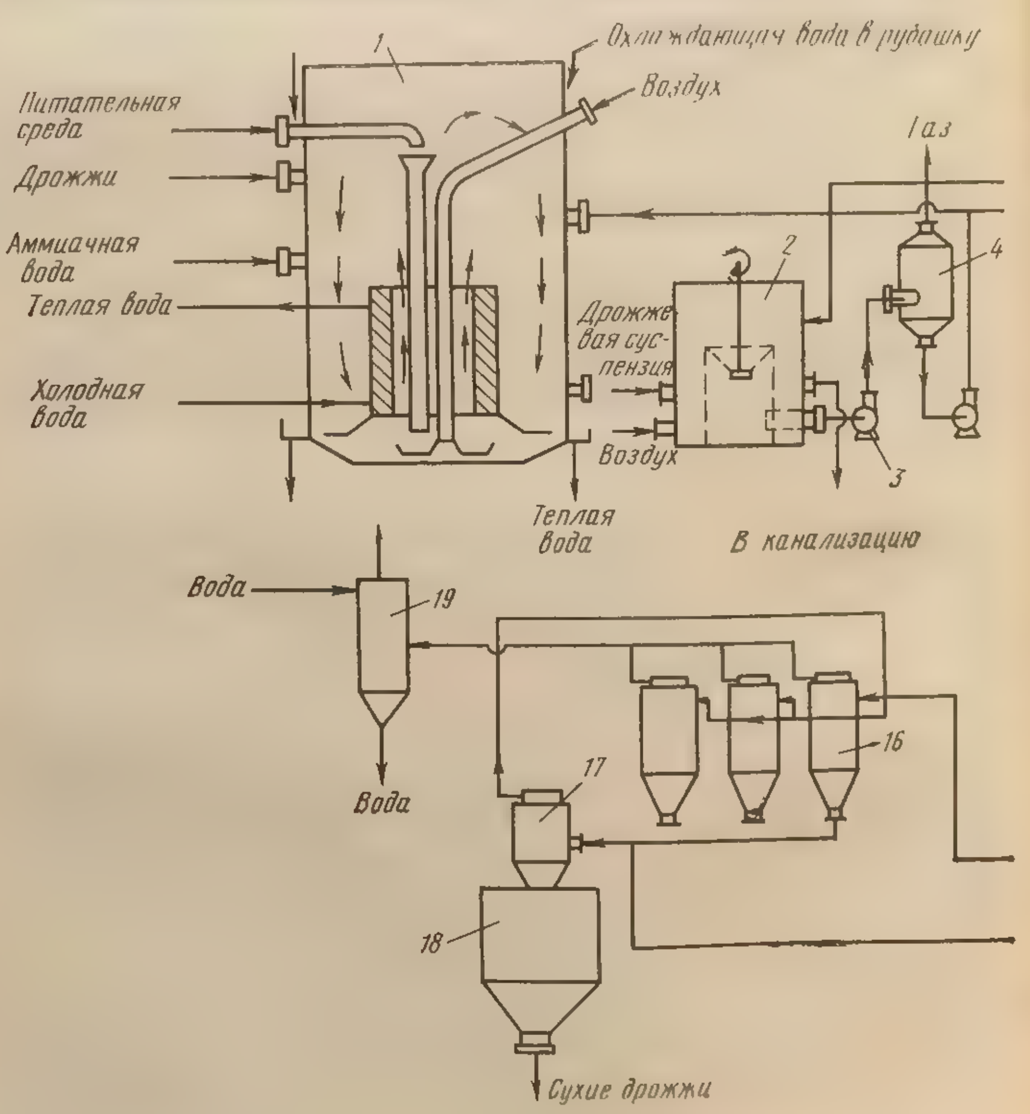
Для удобства погрузки мешков автопогрузчиком в железнодорожные вагоны или на автотранспорт рампа и пол склада обычно делаются на одной отметке. При загрузке вагонов автопогрузчик снимает штабеля (пакеты) мешков на поддонах и отвозит их на место укладки в вагоны. В вагоны мешки укладываются без поддонов. В один крытый вагон грузоподъемностью 50 т вмещается 18—20 т сухого продукта.

Склад кормового белка и упаковочное отделение относятся к категории взрывоопасных помещений. Поэтому требуется принять меры по созданию условий безопасной работы, в частности на бункерах должны быть

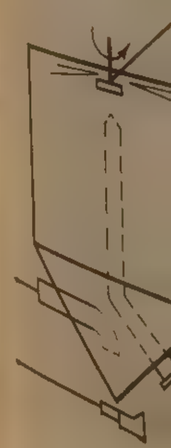
установлены взрывные клапаны, электропроводка должна быть выполнена во взрывобезопасном исполнении и т. д.

§ 4. АППАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА СТАДИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕНИЯ И СУШКИ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Микроорганизмы — продуценты белка — выращивают в ферментаторе *1* (рис. 41), куда задают питательную среду, соли, аммиачную воду, воздух и засевную чистую культуру микроорганизма из посевного аппарата. Готовая культуральная жидкость с биомассой из







ферментатора насосом перекачивается во флотатор *2*, где происходит разделение ее на богатую клеточной биомассой пену и отработанную культуральную жидкость. Из внутреннего стакана флотатора дрожжевая суспензия перекачивается насосом *3* через газоотделитель *4* на сепараторы *5* I группы. Отработанная культуральная жидкость из этой группы сепараторов для снижения потерь биомассы отводится на флотаторы или же сливается через очистные сооружения в канализацию, а дрожжевая суспензия поступает самотеком в сборник *7*, откуда водоструйным насосом *8* перекачивается на

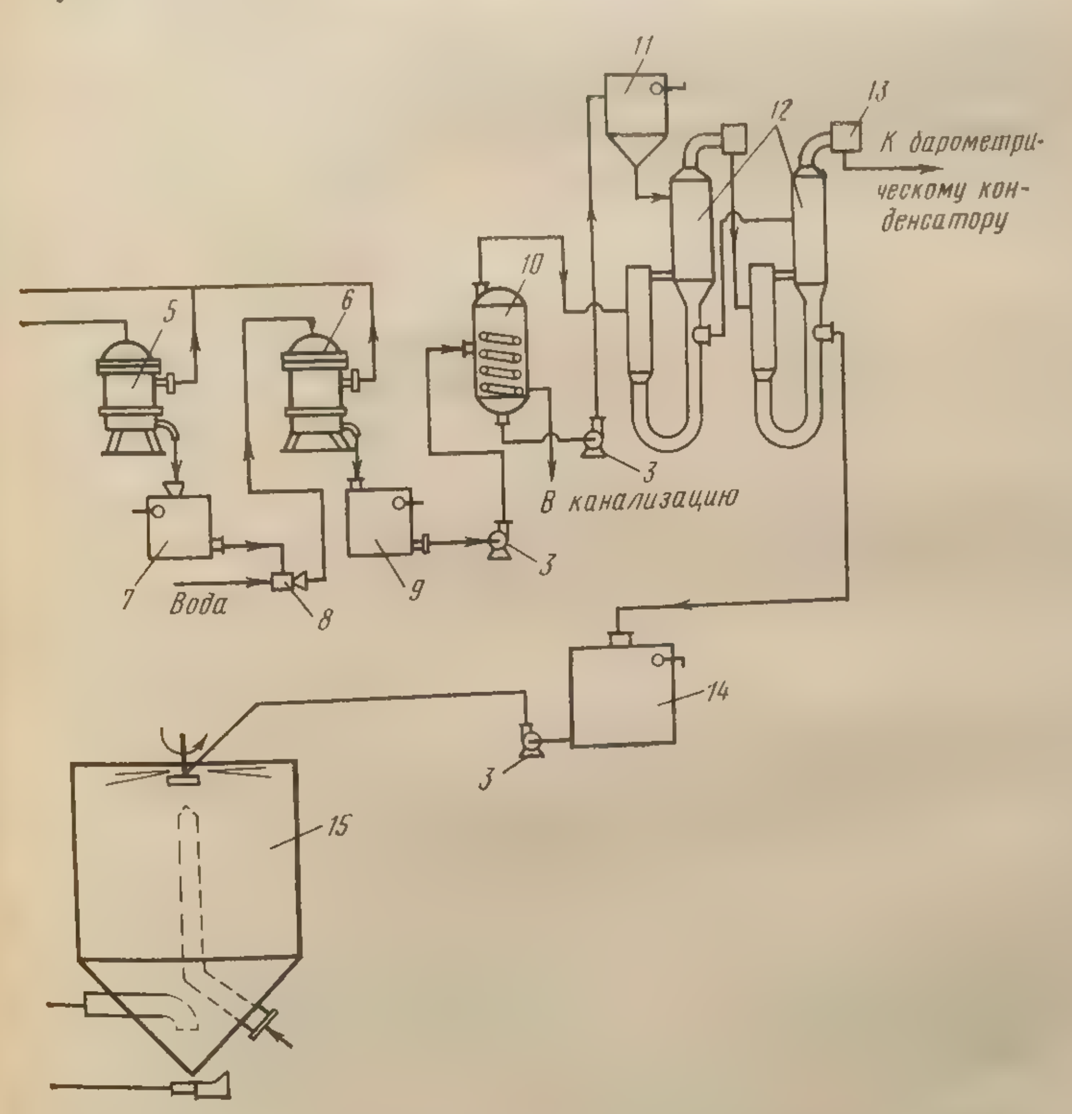


Рис. 41. Аппаратурно-технологическая схема стадий выращивания, выделения и сушки дрожжей.

сепараторы II группы *6*. В водоструйном насосе дрожжи отмываются от остатков культуральной жидкости.

В технологических схемах, где отсутствуют флотаторы, жидкость из ферментаторов поступает непосредственно на сепараторы.

Концентрированная суспензия белковой биомассы после II группы сепараторов самотеком поступает в сборник *9*, откуда насосом перекачивается в плазмолизатор-подогреватель *10* непрерывного действия. Из плазмолизатора суспензия перекачивается в напорный бак *11*, где некоторое время выдерживается перед поступлением на стадию упаривания.

Упаривание суспензии клеточной биомассы происходит в двухкорпусной вакуум-выпарной установке *12*. Вторичный пар, образующийся при упаривании суспензии в первом корпусе установки, отделяется от нее в испарителе и, пройдя ловушку *13*, поступает в греющую камеру подогревателя второго корпуса выпарной установки. Упаренный концентрат биомассы непрерывно отбирается из второго корпуса и направляется насосом в сборник *14*. Из сборника дрожжевой концентрат насосом подается в распылительную сушилку *15*. Образующийся сухой порошкообразный препарат отводится пневмотранспортом в циклон *17* упаковочного отделения и далее в бункер *18*. Отработанный сушильный агент для улавливания увлекаемых частиц продукта пропускается через сепарационную установку, состоящую из ряда циклонов *16*, и затем выбрасывается в атмосферу через скруббер *19*, орошаемый водой. Отделенный от сушильного агента порошок сухого белкового препарата также пневмотранспортом подается в бункер, откуда готовый продукт поступает на упаковку в специальную тару и на складирование.

Глава 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГИДРОЛИЗАТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И СУЛЬФИТНЫХ ЩЕЛОКАХ

Ежегодно на Земле растениями образуется огромное количество целлюлозы. По меньшей мере, 25% этой целлюлозы может быть использовано для энергетических

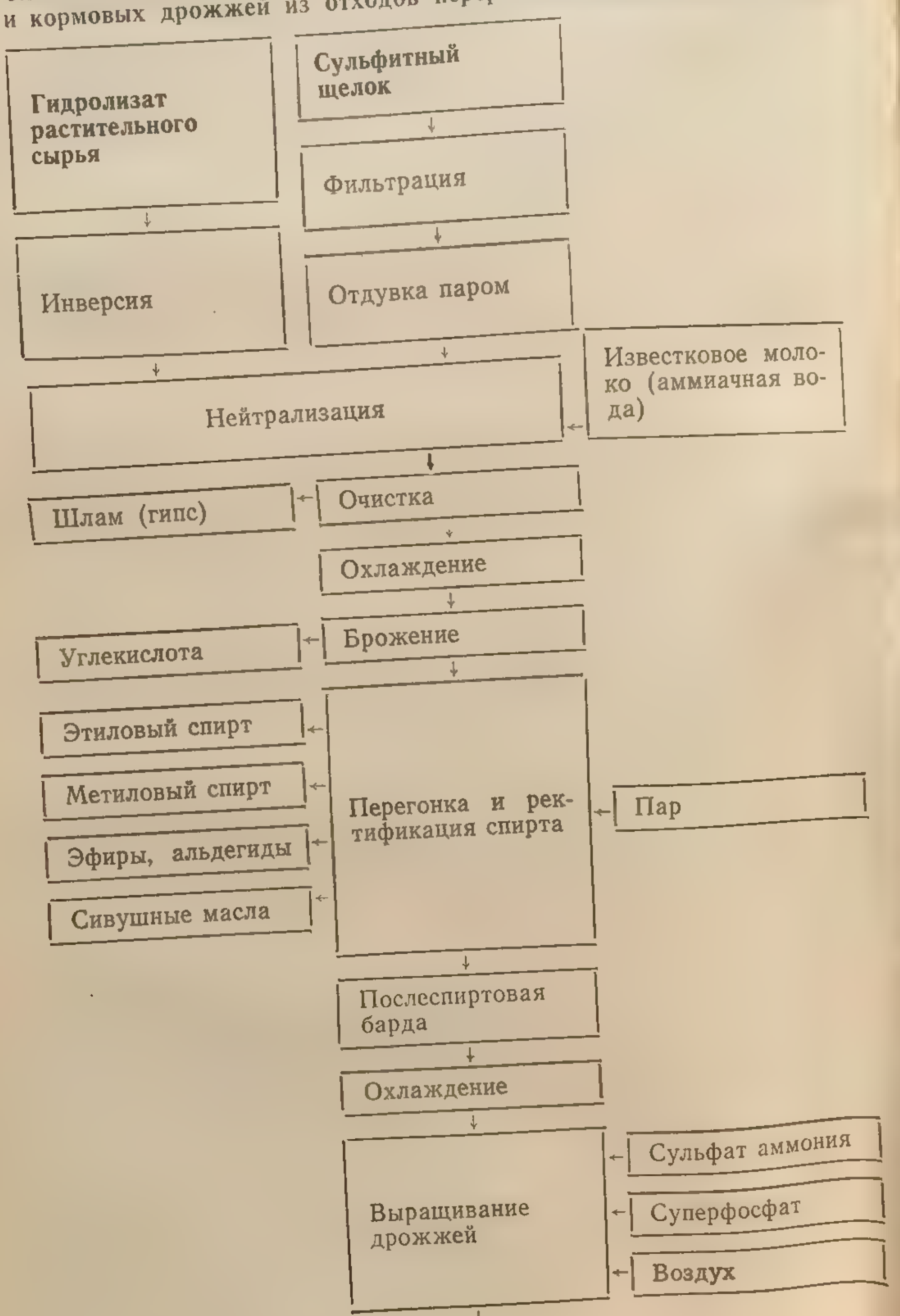
целей, получения кормовых и пищевых продуктов, для химической промышленности. Несмотря на широкое использование целлюлозосодержащего сырья, проблема полной утилизации всех отходов переработки растений остается до конца не решенной, хотя и очень перспективной для всего человечества. Главная задача заключается в том, чтобы найти рациональные способы утилизации этих отходов.

Большой интерес представляет проблема превращения отходов растений в субстрат, усваиваемый микроорганизмами. Например, при гидролизе полисахаридов до моносахаридов получаются гидролизаты, на которых можно выращивать микроорганизмы, продуцирующие белок. Такие богатые белком микробные массы могут идти непосредственно на корм скоту или использоваться для получения других важных для народного хозяйства продуктов.

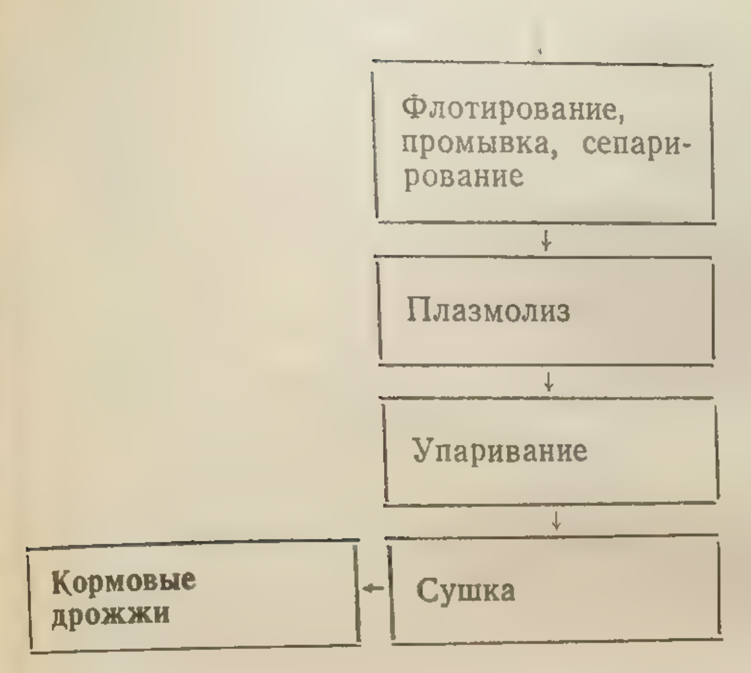
Комплексная переработка отходов древесного и сельскохозяйственного сырья методом гидролиза — высокоэффективное производство. В настоящее время гидролизно-дрожжевая промышленность развивается в двух основных направлениях: получение этилового спирта методом сбраживания гидролизатов древесины и различных видов сельскохозяйственных отходов, сульфитного щелока и предгидролизатов с последующим использованием послеспиртовой барды для производства кормовых дрожжей; получение кормовых дрожжей непосредственным культивированием их на гидролизатах без выработки этилового спирта.

В соответствии с первым направлением гексозный сахар сбраживается дрожжами до этилового спирта и углекислоты, а пентозный сахар, оставшийся несброженным, может использоваться для получения кормовых дрожжей. Это традиционная комплексная схема использования сырья, по которой работают многие действующие заводы (схема 2). По этой схеме кислотные гидролизаты растительных отходов после дополнительной обработки (инверсии), обеспечивающей более полный гидролиз растворимых олиго- и полисахаридов до моносахаридов, а сульфитный щелок — после отделения волокон целлюлозы и десульфитации, подвергаются нейтрализации известковым молоком или аммиачной водой. Очищенные от механических примесей и нейтрализован-

Схема 2. Основные стадии процесса производства этилового спирта и кормовых дрожжей из отходов переработки растительного сырья



Продолжение



ные гидролизат или сульфитный щелок охлаждаются до 31—32° С и подаются на спиртовое брожение. Сброженный раствор (готовая бражка) поступает на перегонку для получения спирта-ректификата. После перегонки спирта в аппарате остается нелетучий остаток, который называется послеспиртовой бардой.

Послеспиртовая барда, содержащая в основном пентозные сахара (0,7—0,8% РВ), после охлаждения поступает в дрожжерастильное отделение. При использовании барды в качестве питательной среды для выращивания кормовых дрожжей в нее добавляют питательные соли, содержащие азот, фосфор, калий и другие необходимые для роста дрожжей элементы. Выращивание дрожжей производится в дрожжерастильных аппаратах при интенсивной аэрации среды воздухом, обеспечивающим клетки дрожжей необходимым количеством кислорода.

Выращенные дрожжи затем проходят все стадии обработки, рассмотренные в принципиальной технологической схеме.

Кормовые дрожжи получают также непосредственной утилизацией всех гексоз и пентоз без получения этилового спирта. На схеме 3 представлены основные этапы производства дрожжей на гидролизатах и сульфитных щелоках. Первые стадии схемы полностью повторяют

Схема 3. Основные стадии процесса производства кормовых дрожжей из отходов переработки растительного сырья

Гидролизат растительного сырья

Инверсия

Сульфитный щелок

Фильтрация

Отдувка паром

Нейтрализация

Известковое молоко (аммиачная вода)

Аммофос

Хлористый калий

Шлам (гипс)

Очистка

Охлаждение

Выращивание дрожжей

Засевные дрожжи

Аммиачная вода

Воздух

Флотирование, промывка, сепарирование

Плазмолиз

Упаривание

Сушка

Кормовые дрожжи

этапы предыдущей схемы: нейтрализация, очистка и охлаждение. Но из этой схемы исключены стадии получения спирта: брожение, перегонка и ректификация. Несколько различаются вспомогательные операции подготовки питательной среды: так, для выращивания кормовых дрожжей по схеме 3 требуется введение в состав среды бóльшего количества питательных солей, более полное удаление фурфурола, предусматривается также разбавление сусла водой и отработанным фильтратом дрожжевой бражки. В качестве источника азота в состав среды вводится аммиачная вода, она же используется для поддержания pH среды в процессе выращивания дрожжей.

Использование той или другой схемы обусловлено плановым заданием предприятию. Если завод производит этиловый спирт, то кормовые дрожжи составляют небольшую долю в общем объеме готовой продукции. Если же завод не производит этилового спирта, то все усваиваемые микроорганизмами питательные вещества переходят в биомассу и кормовые дрожжи становятся главным товарным продуктом.

Например, при переработке 1 т абсолютно сухой хвойной древесины по схеме 2 образуется 175–182 л этилового спирта, 0,3 кг сивушных масел, 70 кг жидкой углекислоты и 32 кг кормовых дрожжей, а при переработке по схеме 3 этилового спирта, сивушных масел и углекислоты не образуется, а выход кормовых дрожжей составляет 135—225 кг (содержание остальных веществ, получающихся в процессе переработки древесины по этим схемам, одинаково).

§ 1. ПОДГОТОВКА СЫРЬЯ

Состав растительных отходов очень сложен и разнообразен. Растения содержат многочисленные органические соединения, образующиеся в результате обмена веществ, протекающего в растениях в процессе их роста и развития: целлюлозу, гемицеллюлозы, лигнин, гумми- и слизевые вещества, пектиновые вещества, крахмал и т. д. Все эти высокомолекулярные вещества не могут непосредственно использоваться микроорганизмами в процессе их жизнедеятельности, необходимо их предварительное расщепление до моносахаридов.

Важнейшими в комплексе биополимеров растений являются полисахариды. В простейшем виде реакция гид-

ролиза полисахаридов может быть представлена в виде следующих уравнений:

$$(C_6H_{10}O_5)_n + (n - 1)\,H_2O \rightarrow \underset{\text{Гексозы}}{C_6H_{12}O_6};$$

$$(C_5H_8O_4)_m + (m - 1)\,H_2O \rightarrow m\,\underset{\text{Пентозы}}{C_5H_{10}O_5}.$$

Реакция гидролиза полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок растений, в чистой воде без участия ферментов при нормальной температуре не протекает. Сложность химического гидролиза целлюлозы и других полисахаридов обусловливается высокой степенью организации структуры их молекул. Поэтому целесообразно подробнее остановиться на строении основных полисахаридных компонентов, содержащихся в растениях.

Характеристика основных компонентов растительного сырья

Целлюлоза (клетчатка) является одним из основных полисахаридов растений, содержание ее достигает 50—70%. Степень полимеризации и структурно-механические свойства целлюлозы зависят от вида растения и его возраста.

На ранних стадиях роста растений целлюлоза имеет низкую степень полимеризации (СП), пориста и обладает более высокой сорбционной способностью по сравнению с целлюлозой созревшего растения. В природных целлюлозосодержащих материалах ей обычно сопутствуют гемицеллюлозы, лигнин, танины, крахмал, а также воски, жиры, белки (от 2 до 10%), смолы, терпены и другие органические соединения.

Целлюлоза представляет собой линейный полимер β-*D*-глюкопиранозы с молекулярной массой 300 000—20 000 000. Элементарные звенья макромолекулы, состоящие из ангидро-*D*-глюкозы, содержат три гидроксильные группы у 2, 3 и 6-го атомов углерода. 1-й и 4-й атомы углерода соседних остатков глюкозы соединены между собой β-гликозидной связью. Продукты неполного гидролиза целлюлозы в зависимости от количества элементарных звеньев состоят из целлобиозы, целлотриозы, целлотетраозы и т. д. При полном гидролизе целлюлозы образуется *D*-глюкоза.

Молекулы целлюлозы не имеют определенной длины, и число глюкозных остатков (СП) может варьировать от 150 до 14 000 со средним значением 3000. У целлюлозы хлопка СП может достигать 1500, у целлюлозы древесины —8000—10 000.

Сравнительно большой разброс данных по СП связан с тем, что целлюлоза является нерастворимым полисахаридом, а попытки обработать ее химическими реагентами приводят, как правило, к частичной деполимеризации молекулы и искажению результатов.

Ввиду регулярности строения полимерной цепи целлюлозу относят к стереорегулярным полимерам. Участки целлюлозы с высокой степенью упорядоченности называют кристаллическими, а участки с беспорядочной ориентацией — аморфными.

Гемицеллюлозы являются неотъемлемым компонентом клеточной стенки растений. Они содержат полисахариды с меньшей молекулярной массой (10 000—40 000) и СП 30—200. Основные компоненты гемицеллюлоз — ксиланы, уроновые кислоты (например, полиглюкуроновая), маннаны, галактаны, фруктозаны, арабиногалактаны и т. д. Наиболее распространены в растениях ксиланы (кукурузная кочерыжка и овсяная шелуха содержат до 28—34% ксилана). Особенно много гемицеллюлоз в семенах, косточках, соломе, подсолнечной лузге, в шелухе хлопковых семян, в кукурузной кочерыжке. В среднем 25% (по массе) органического вещества однолетних растений представлено гемицеллюлозами. Лиственные породы деревьев содержат гемицеллюлоз в 1,5 раза больше, чем хвойные.

Растительные гемицеллюлозы обычно представлены как гомо-, так и гетерополисахаридами, разнородными по строению, молекулярной массе и составу. При гидролизе они дают разнообразный набор соединений: *D*-фруктозу, *D*-ксилозу, *D*-галактозу, *D*-маннозу, *L*-арабинозу, *L*-рамнозу, *D*-глюкозу; *D*-галактуроновая и 4-*O*-метил-*D*-глюкуроновая кислоты обычно присутствуют в виде боковых ответвлений. Моносахариды входят в состав гемицеллюлоз в пиранозной и фуранозной формах, уроновые кислоты — в пиранозной форме.

Отдельные моносахариды в молекулах гемицеллюлоз связаны между собой β-1→3, β-1→2, β-1→4 и β-1→6 связями. Гемицеллюлозы изучены недостаточно, достоверных данных об их составе, структуре и классификации

пока нет. Неустойчивость трактовки понятия «гемицеллюлозы» связана со сложностью их строения и фракционирования на индивидуальные вещества.

Лигнин — инкрустирующий групповой полимер «ароматического» характера, построен в основном из фенилпропановых структурных звеньев. В естественных условиях лигнин как таковой не существует, а представляет собой лигнин-полисахаридный комплекс, в котором предполагается наличие химической (лигно-углеводной) связи. При выделении лигнина различными методами получены лигно-ксилановые комплексы. В кислой среде гидролизуются гликозидные связи внутри молекул ксилана, связи между лигнином и ксиланом не нарушаются.

В перерабатываемой древесине содержится 20–30% лигнина. Гидролизная и целлюлозно-бумажная промышленность получают ежегодно в виде отходов около 4,5 млн. т лигнина (в пересчете на абсолютно сухое вещество). Только 20—30% от этого количества используется в производстве в качестве топлива и для получения углей различного назначения. Химическая переработка «гидролизного» лигнина для получения других ценных продуктов (нитролигнина, сунила, игетана) организована пока в очень малых масштабах на опытно-промышленных установках.

При сульфитной варке древесины лигнин растворяется и переходит в сульфитный щелок в виде лигносульфонатов. Химической переработкой небольшой части лигносульфонатов получают ванилин, фенолы и их производные, органические кислоты, угли.

Существует несколько методов выделения лигнина (делигнификация), например обработка его растворами сильных щелочей. Некоторые микроорганизмы (дереворазрушающие грибы) способны вызвать деструкцию лигнина под действием комплекса экзоферментов, основными из которых являются фенолаза и лакказа.

Способы гидролиза растительного сырья

Существует два принципиально различных способа гидролиза растительного сырья: ферментативный, осуществляемый с помощью ферментов, и наиболее широко распространенный химический, основанный на использовании кислот в качестве катализаторов.

Ферментативный гидролиз

Разложение целлюлозы микроорганизмами, как было установлено С. Н. Виноградским, А. А. Имшенецким, происходит под действием микробных внеклеточных ферментов.

Разрушающие целлюлозу ферменты (целлюлазы) образуются в результате биосинтетической деятельности микроорганизмов. К целлюлазам относится целый комплекс ферментов, которые постадийно гидролизуют целлюлозу до глюкозы. Наибольшее значение имеет фермент, нарушающий упорядоченную кристаллическую структуру целлюлозы, так называемый C_1-фермент, или C_1-компонент.

Этот фермент пока не смогли выделить в абсолютно чистом виде с полным сохранением активности и потому только предполагают, что он не выполняет гидролитических функций, а, возможно, ослабляет или разрывает водородные связи между отдельными целлюлозными цепями, превращая кристаллические участки ее структуры в более реакционноспособные, доступные для действия комплекса гидролитических целлюлазных ферментов, которые принято называть C_x-ферментами. В настоящее время этот термин все реже употребляется и заменяется в научной литературе на β-1→4-глюканазы.

Различают две основные группы β-1→4-глюканаз, обладающих эндо- и экзодействием. Экзо-β-1→4-глюканазы последовательно разрывают глюкозидные связи с нередуцирующего конца целлюлозной цепи, и в реакционной смеси накапливается глюкоза. Эндо-β-1→4-глюканазы разрывают целлюлозную цепочку неупорядоченно, по всей ее длине, в результате накапливаются дериваты целлюлозы различной молекулярной массы и СП, образуется некоторое количество целлобиозы. Есть предположение, что дисахарид целлобиоза далее гидролизуется до глюкозы β-глюкозидазой.

Процесс ферментативного гидролиза целлюлозы в самом общем виде можно представить следующей схемой (рис. 42).

Ферментативный гидролиз целлюлозы постоянно осуществляется в природе при разложении растительных остатков микроорганизмами. Наибольшей способностью к синтезу целлюлазного комплекса ферментов обладают среди аэробных организмов микроскопические грибы, например грибы из рода Trichoderma. Но этот процесс идет медленно, что объясняется прежде всего сложностью строения субстрата.

Для того чтобы целлюлозные микрофибриллы с очень сложной структурной организацией деполимеризовались целлюлазами до образования растворимых, легкоусвоя-

емых микроорганизмами продуктов, необходимы условия, обеспечивающие диффузию ферментов в структурный матрикс (основу) целлюлозы и образование комплекса фермент — субстрат. В отличие от других типов ферментативных реакций, которые протекают в растворе, целлюлаза действует на разделе фаз раствора фер-

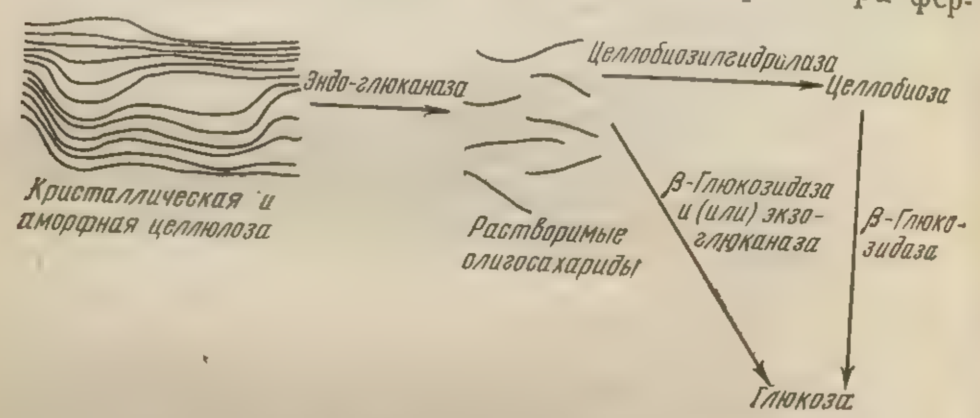


Рис. 42. Схема ферментативного гидролиза целлюлозы.

мента и нерастворимой поверхности субстрата.

Существует прямая пропорциональная зависимость между величиной площади поверхности субстрата и скоростью ферментативного гидролиза целлюлозы. Скорость ферментативного гидролиза пропорциональна количеству фермента, адсорбированного на субстрате.

Ферментативный гидролиз растительного сырья в промышленном масштабе пока не проводится. Это объясняется отсутствием высокоактивных препаратов, способных превращать нативную целлюлозу в реакционноспособный продукт, доступный для действия гидролитических ферментов. Помимо C_1-компонента это превращение может осуществляться в результате механического или физико-химического воздействия на целлюлозу (размалывание, солнечная радиация, а также действие малых количеств перекиси водорода в присутствии ионов железа и др.).

Проблемой ферментативного расщепления целлюлозы в настоящее время заняты многие научно-исследовательские лаборатории мира. Решение этой задачи может открыть неограниченные возможности для получения с помощью микроорганизмов белковых и других биологически активных веществ.

Химический гидролиз

Наиболее активными химическими катализаторами реакции гидролиза полисахаридов растительной ткани являются минеральные кислоты и щелочи. При обработке растительного сырья кислотой лигнин остается нерастворимым, а целлюлоза и гемицеллюлозы гидролизуются. Щелочь, частично растворяя лигнин, не расщепляет целлюлозу и гемицеллюлозы полностью, однако делает их более доступными для последующего воздействия ферментов микроорганизмов, которые способны расти на этом субстрате. Поэтому щелочная обработка целлюлозы может быть перспективной в комбинации с ферментативным гидролизом.

Практический интерес представляют процессы гидролиза серной и соляной кислотами. При этом для гидролиза используются кислоты как в концентрированном виде, так и в виде растворов низкой концентрации (0,5—5,0%). Для гидролиза разбавленными кислотами применяется только серная кислота. Соляная кислота в разбавленных растворах очень агрессивна, что создает большие трудности в аппаратурном оформлении этого процесса.

Количественно процесс гидролиза оценивается по выходу редуцирующих веществ, выражаемому в процентах от массы абсолютно сухого сырья.

Сравнение различных режимов гидролиза может проводиться по величине гидромодуля, определяемого отношением количества подаваемой на гидролиз воды (кислоты) или получаемого гидролизата к количеству загружаемого абсолютно сухого сырья.

Модуль выдачи (или отбора) гидролизата — это отношение массы гидролизата, отобранной из гидролизаппарата, к массе абсолютно сухого сырья. Количество гидролизата определяют после самоиспарения по его объему в сборнике гидролизата или в нейтрализаторе до подачи нейтрализующего реагента. Время пребывания жидкости в гидролиз-аппарате определяется отношением величины рабочего объема аппарата к объему отбираемого гидролизата в единицу времени.

Гидролиз концентрированными кислотами. Концентрированная соляная кислота обычной концентрации (37—38%) очень медленно гидролизует целлюлозу. Для

ускорения гидролиза необходима сверхконцентрированная кислота, содержащая 41—42% HCl.

Из различных вариантов гидролиза концентрированной серной кислотой наиболее перспективным оказался способ механохимической деструкции полисахаридов целлолигнина с модулем выхода 30. По этому методу некоторое время работала экспериментальная установка, но промышленного выхода способ пока не получил.

Гидролиз концентрированными кислотами характеризуется большим расходом кислоты. Даже при гидролизе с малым модулем ее расход в 4 раза выше, чем при гидролизе разбавленными кислотами. Кроме того, при малом модуле велик удельный расход электроэнергии на тонкое измельчение сырья. Требуется специальное оборудование с очень прочными кислотоупорными покрытиями. Все это, а также большие удельные капиталовложения определяют относительно высокую себестоимость получаемых гидролизатов.

Гидролиз разбавленными кислотами. Гидролизные заводы нашей страны применяют для гидролиза разбавленную серную кислоту концентрацией 0,4—0,6%. Гидролиз проводят при температуре 175—190° С и соответствующем давлении. Этому способу свойствен большой расход пара. Выход редуцирующих веществ достигает 46—50% от массы абсолютно сухого сырья. При гидролизе разбавленной серной кислотой из 1 т абсолютно сухой древесины получают до 200 кг дрожжей и 4—6 кг фурфурола.

Существуют периодические и непрерывные способы гидролиза, различающиеся положением гидролизуемого материала, т. е. твердой фазы: при периодических способах она неподвижна, при непрерывных — находится в движении. Применение непрерывных способов гидролиза может привести к увеличению выхода РВ до 53—56%, к улучшению качества гидролизатов и снижению себестоимости до 20—30%, однако эти способы пока находятся в стадии освоения.

В промышленности в настоящее время используется перколяционный способ гидролиза. По этому способу жидкая фаза проходит через слой неподвижной твердой фазы, причем твердая фаза должна быть полностью погружена в жидкость. Перколяционный способ гидролиза имеет разновидности, позволяющие изменять удельную производительность гидролизаппаратов, повышать температуру гидролиза и умень-

шать расход кислоты. Возможны следующие варианты перколяции.

вертикальная перколяция — жидкая фаза передвигается сверху вниз; гидролизат отбирается снизу. По этой схеме работает большинство гидролизных заводов Советского Союза;

вертикально-горизонтальная перколяция — жидкая фаза вначале передвигается сверху вниз и отбирается снизу, а во второй половине процесса гидролиза — в горизонтальной плоскости по всей высоте твердой фазы и отбирается с помощью лучевых труб по всей высоте;

комбинированная перколяция — часть жидкой фазы проходит сверху вниз, а часть — горизонтальным потоком; соответственно этому и отбор жидкости производят в двух местах одновременно: снизу и сбоку по высоте слоя твердой фазы.

Правильное применение смешанного потока, т. е. вертикально-горизонтальной перколяции, проводимой на ряде гидролизных заводов, дает наилучшие результаты по выходу продукции и затратам основных материалов.

Принципиальная схема гидролиза растительного сырья представлена на рис. 43. Она состоит из следующих операций: гидролиза, проводимого в периодически действующих гидролиз-аппаратах, подачи на гидролиз серной кислоты и воды, частичного охлаждения полученного гидролизата в испарителях, инверсии (дополнительного гидролиза).

Растительное сырье (измельченная щепа в смеси с опилками) подается через верхнюю горловину в гидролиз-аппарат *5*. В верхнем конусе гидролиз-аппарата имеется специальный штуцер, через который из смесителя *3* непрерывно поступает горячая разбавленная серная кислота. Она получается смешиванием горячей воды (180—190° С) после водонагревателя и концентрированной серной кислоты. В соответствии с заданной концентрацией разбавление кислоты для перколяции в смесителе регулируется соотношением потоков подогретой воды и концентрированной серной кислоты.

До начала перколяции для подогрева содержимого гидролиз-аппарата в нижний его конус подается острый пар. Для удаления воздуха из гидролиз-аппарата в верхнем конусе имеется штуцер *4*. Контроль давле-

ния осуществляется с помощью манометра, сообщающегося с пространством под верхней крышкой гидролиз-аппарата.

После подогрева аппарата до заданной температуры начинается стадия перколяции (одновременная подача варочной кислоты и выдача гидролизата). Из гидролиз-аппарата перегретый гидролизат температурой

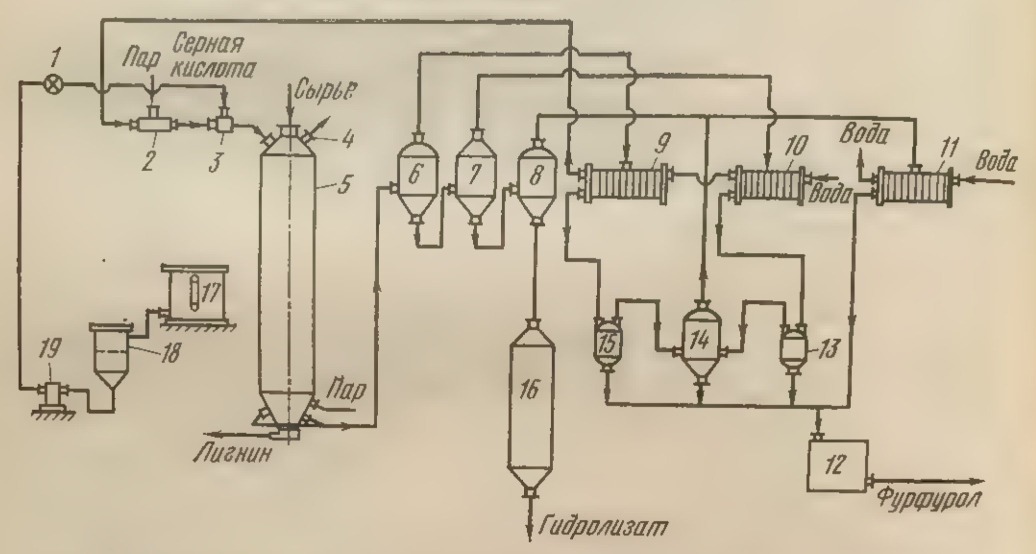
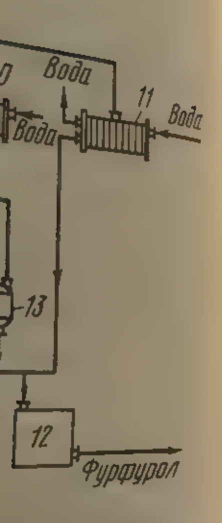


Рис. 43. Аппаратурно-технологическая схема получения гидролизата:

1 — обратный клапан; *2* — струйный водоподогреватель; *3* — смеситель серной кислоты и горячей воды; *4* — штуцер для удаления воздуха; *5* — гидролиз-аппарат; *6, 7, 8* — испарители; *9, 10, 11* — конденсаторы пара соответственно I, II и III ступеней испарителей; *12* — сборник фурфурола; *13, 15* — отделители конденсата I и II ступеней; *14* — испаритель конденсата; *16* — инвертор; *17* — мерник кислоты; *18* — фильтр кислоты; *19* — плунжерный насос.

150—185° С подается на охлаждение в систему последовательно соединенных испарителей *6*, *7* и *8* (три ступени испарения). Работа испарителей регулируется так, чтобы в первом испарителе было наибольшее давление, а в последнем оно было близко к атмосферному. С последней ступени испарения гидролизат температурой 100—105° С поступает в инвертор *16*. После дополнительного гидролиза (инверсии) гидролизат передается на обработку, необходимую для последующего выращивания дрожжей.

При охлаждении гидролизата в испарителях часть его (до 10%) превращается в пар. С паром уходит значительная часть фурфурола. Для регенерации содержащегося в парах самоиспарения гидролизата теп-



ла пары охлаждают и конденсируют в системе теплообменных аппаратов.

Пары из испарителя высокого давления *6* температурой 140—150° С поступают в соответствующий конденсатор высокого давления *9*. Образующийся при этом конденсат через конденсационный горшок, пропускающий только жидкость, поступает в испаритель *15*.

Пары самоиспарения гидролизата из испарителя второй ступени *7* с температурой 120° С и испарителя третьей ступени *8* с температурой 140° С поступают в соответствующие теплообменники *10* и *11*, конденсат из которых направляется в испаритель конденсата *14*. Состав конденсата изменяется в зависимости от характера перерабатываемого сырья и режима гидролиза.

В конденсаторах I, II и III ступеней параллельно с конденсацией паров происходит предварительный нагрев воды, используемой затем для смешивания с концентрированной серной кислотой. Вода, используемая в гидролизном производстве, должна иметь временную карбонатную жесткость не более 0,7 мг-экв, в противном случае на стенках аппаратуры выпадает сернокислый кальций. Более жесткую воду предварительно подвергают химической очистке с целью ее умягчения.

Основным аппаратом в схеме получения гидролизатов является гидролиз-аппарат. Эти реакторы, эксплуатируемые до последнего времени в промышленности, имеют объемы 18, 30, 38, 50, 70 и 160 м³. Однако практика работы заводов показала, что гидролиз-аппараты объемом 70 м³ и выше использовать нецелесообразно, так как производительность 1 м³ рабочей емкости такого реактора падает по сравнению с аппаратом объемом 38 м³ в 2 раза, а рабочий объем уменьшается за счет футеровки на 20%, в то время как при объеме 38 м³ — лишь на 10%. Конструктивно гидролиз-аппараты объемом 38 и 70 м³ одинаковы.

Гидролиз-аппарат периодического действия представляет собой вертикальный цилиндр, верх и низ которого заканчиваются усеченными конусами (рис. 44). В верхней части аппарата расположено загрузочное отверстие, герметически закрываемое поворотной механизированной крышкой с полукольцевыми захватами. Здесь же расположены штуцера для подачи кислоты *10*, воды

9 и сдувки паров и газов *8*. В средней части аппарата на цилиндрической поверхности приварены опорные лапы, одна из которых устанавливается на датчик манометрического весомера *15*, другая — на две шарнирные опоры, которые обеспечивают перемещение системы в зависимости от температурных изменений и исключают воздействие горизонтальных усилий на датчик весомера.

В нижней конусной части гидролиз-аппарата установлено фильтрующее устройство для отделения гидролизата от лигнина и быстрооткрывающийся клапан *1* для выгрузки лигнина.

Корпус гидролиз-аппаратов обычно изготавливается сварной, из листовой стали или титана. Отношение диаметра к высоте у разных гидролиз-аппаратов колеблется от 1 : 2,3 до 1 : 4,5. Такие габариты являются наиболее удобными для проведения перколяции.

Стальные гидролиз-аппараты должны быть защищены внутри кислотоупорным слоем от корродирующего действия горячей разбавленной серной кислоты. Футеровка состоит из сплошного слоя бетона с шамотом, примыкающего к стальному корпусу. Внутренняя поверхность бетонного слоя толщиной 70—90 мм облицовывается специальными термокислотостойкими керамическими плитками. Плитки и

Рис. 44. Гидролиз-аппарат:
1 — быстрооткрывающийся клапан для выгрузки лигнина; *2* — штуцер для выхода воды; *3* — штуцер для выхода лигнина; *4* — штуцер для входа воды; *5*, *18* — штуцера для входа и выхода воздуха; *6* — труба для отбора гидролизата; *7* — шарнирная опора; *8* — штуцер для сдувки паров; *9* — штуцер для входа воды; *10* — штуцер для входа кислоты; *11* — труба для подачи воды и кислоты; *12* — термокислотоупорные плитки; *13* — шамотный кирпич (на бетонном слое); *14* — стальной корпус; *15* — весомер; *16* — теплоизоляция; *17* — штуцер и лучевые трубки для отбора гидролизата.

кирпич укрепляются на бетонной подмазке, а швы между ними промазываются андезитовой замазкой, изготовляемой на жидком стекле, или кислотоупорным цементом с шамотом. Для уменьшения потерь тепла наружная поверхность гидролиз-аппарата покрывается теплоизоляцией.

Сырье в гидролиз-аппарат подают транспортером, расположенным над загрузочным отверстием. Количество растительного сырья зависит от его состава, степени измельчения и влажности. При загрузке одновременно с сырьем в аппарат подают воду.

Смачивание увеличивает плотность загрузки в среднем на 5—7% в зависимости от используемого сырья. Так, при загрузке стружки без смачивания плотность загрузки составляет 100 -105 кг/м³, со смачиванием — 115—120 кг/м³. Увеличение степени измельчения приводит к повышению величины удельной плотности загрузки: для щепы она составляет со смачиванием 127—138 кг/м³, для опилок — 130—135 кг/м³. При использовании смеси щепы и опилок плотность загрузки возрастает, при соотношении компонентов 2 : 1 она составляет соответственно без смачивания и со смачиванием 140—150 и 145—160 кг/м³. При гидролизе таких отходов сельскохозяйственных растений, как подсолнечная лузга и кочерыжки, для увеличения плотности загрузки их предварительно измельчают на вальцовых дробилках. Обработка вальцеванием подсолнечной шелухи увеличивает плотность загрузки с 80—110 до 160 кг/м³.

Наиболее распространенным способом уплотнения сырья в гидролиз-аппарате является одновременная загрузка его сырьем и смачивание разбавленной серной кислотой. При этом плотность загрузки опилок возрастает на 8—10%.

Время загрузки гидролиз-аппаратов сырьем зависит от их объема и производительности загрузочных устройств и колеблется от 25 до 40 мин. Продолжительность работы гидролиз-аппарата объемом 70 м³ при гидролизе растительного сырья распределяется следующим образом (в мин): загрузка — 35—40, подогрев — 50, перколяция — 140, промывка — 25—30, сушка (отжим) — 40, «выстрел» (отделение лигнина) — 10. Процесс гидролиза любых растительных материалов проводится в гидролиз-аппаратах различных объемов с одинаковой последовательностью операций.

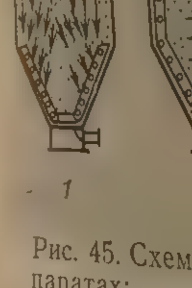
После загрузки аппарат герметично закрывают крышкой и прогревают содержимое острым паром, который подают через штуцер в нижней горловине. В период подогрева давление поднимается до 0,5 МПа и производится 2—3-минутная сдувка воздуха через верхний шту-

цер *4* (см. рис. 43) и сдувочную линию в ловушку для сдувочного пара. При этом удаляются воздух и другие неконденсирующиеся газы, температура приводится в соответствие с давлением в аппарате.

Начальный период гидролиза проводят в относительно мягких условиях, при температуре около 150° С. Постепенно температуру подаваемой в гидролиз-аппарат воды и варочной кислоты повышают до 175—190° С. Соответственно изменяется температура внутри гидролиз-аппарата, т. е. температура, при которой фактически идет процесс гидролиза. Через 50 мин после начала перколяции температура выравнивается по всему объему аппарата.

Подачу воды и варочной кислоты при вертикальной перколяции производят через верхние штуцера гидролиз-аппарата *9* и *10* (см. рис. 44). Варочная кислота, проходя через весь слой нагретого сырья, гидролизует растительные ткани. Образующийся гидролизат отводится через нижнюю часть фильтрующих труб *6*, коллектор и штуцер. В первый период перколяции скорость отбора гидролизата относительно высока, постепенно фильтрующая способность сырья снижается. Кроме того, температура реакционной среды повышается, достигая точки кипения. Кипящая жидкость фильтруется через слой лигнина в 2,0—2,5 раза медленнее, чем некипящая. Поэтому для уменьшения сопротивления фильтрующего слоя и увеличения скорости отбора гидролизата изменяют направление перколяции на горизонтальное. При горизонтальной перколяции вода и варочная кислота поступают в аппарат через перфорированную трубу *11*, а гидролизат отбирается через удлиненные части труб *6*, расположенных в цилиндрической части аппарата. Переход на горизонтальную перколяцию позволяет вновь повысить скорость отбора гидролизата.

По окончании процесса перколяции проводят промывку лигнина водой, подавая ее сверху вниз, как при вертикальной перколяции для извлечения оставшихся сахаров. Процесс промывки заканчивается с прекращением подачи воды, но гидролизат продолжают отбирать еще приблизительно 40 мин — это сушка, или отжим лигнина. Объем отбираемого гидролизата должен быть



в 15—17 раз больше массы абсолютно сухой древесины, пошедшей на гидролиз.

Выброс лигнина («выстрел») осуществляют при давлении в гидролиз-аппарате 0,6—0,7 МПа открытием на несколько секунд быстродействующего клапана *1*. Лигнин из гидролиз-аппарата поступает по касательной в циклон, где из него за счет самоиспарения и потери ско-

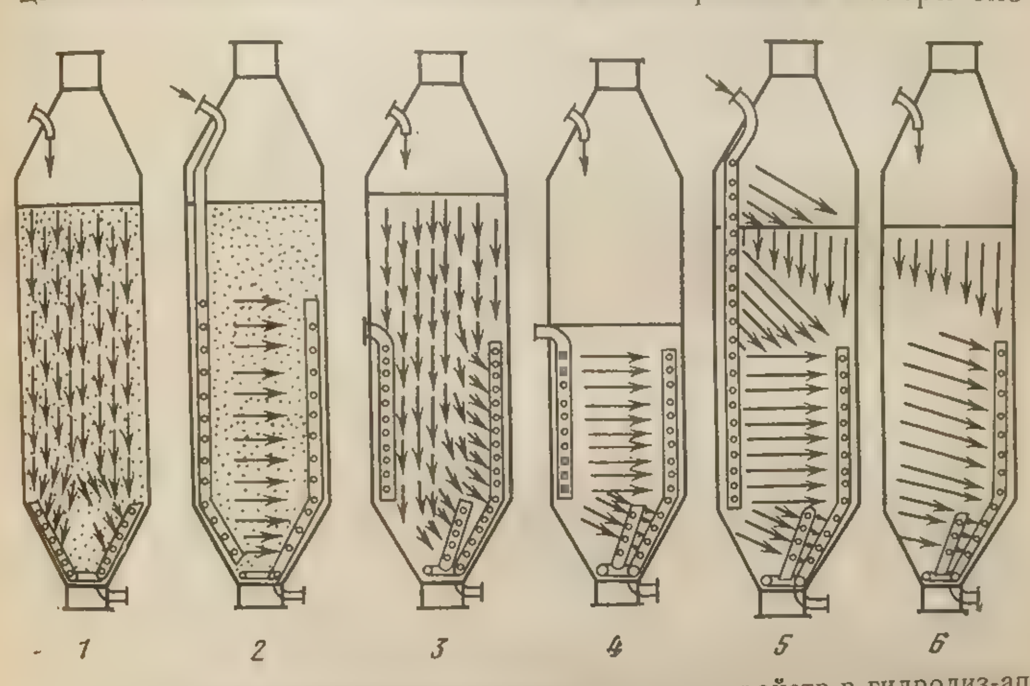


Рис. 45. Схемы расположения фильтрующих устройств в гидролиз-аппаратах:

1 — при вертикальной и *2* — горизонтальной перколяции в одном направлении; *3* — при вертикальной и *4* — горизонтальной перколяции с переменным потоком жидкости; *5* — при совмещенной перколяции с удлиненной и *6* — без удлиненной подающей трубы.

рости частиц удаляется часть влаги в виде пара. Осевший на дно циклона лигнин с помощью выгрузочного устройства подается на транспортер либо на автомашины для вывоза за пределы завода.

Применяемые для отбора гидролизата из различных частей аппарата короткие и длинные трубы (лучи) выполняют роль трубчатых фильтров. Они представляют собой систему кислотоупорных труб с отверстиями диаметром 4 мм по всей поверхности. Расположение трубчатых фильтров в гидролиз-аппарате определяет направление перколяции и скорость удаления гидролизата. На рис. 45 приведены схемы расположения таких фильтрующих устройств.

Закономерности кинетики гидролиза разбавленными кислотами

Гидролиз полисахаридов в общем виде можно представить следующей схемой:

$$\text{Полисахариды} \xrightarrow{\text{гидролиз}} \text{Моносахариды} \xrightarrow[\text{сахаров}]{\text{распад}} \text{Продукты распада.}$$

Количество моносахаридов, реально присутствующих в данный момент в реакционной среде, зависит от относительных скоростей этих двух последовательно текущих реакций. Чем выше скорость гидролиза полисахаридов и ниже скорость распада моносахаридов, тем выше выход сахаров. Для количественной оценки этих реакций необходимо получить общее уравнение, описывающее кинетику каждой реакции в отдельности.

Кинетика гидролиза полисахаридов. Наиболее простым примером этой реакции является гидролиз дисахаридов, например целлобиозы: $\underset{\text{Целлобиоза}}{C_{12}H_{22}O_{11}} + H_2O \rightarrow \underset{\text{Глюкоза}}{2C_6H_{12}O_6}$.

Так как в процессе гидролиза одновременно изменяется концентрация целлобиозы и воды, эта реакция является бимолекулярной. Однако, если учесть, что один компонент реакции — вода — при гидролизе разбавленными кислотами находится в большом избытке, изменением ее концентрации пренебрегают и реакцию гидролиза олиго- и полисахаридов рассматривают как мономолекулярную, или реакцию первого порядка. Скорость реакции первого порядка можно записать в виде дифференциального уравнения

$$\frac{dx}{d\tau} = K_1 (a - x),$$

где a — количество полисахарида до гидролиза;
x — количество полисахарида, гидролизованное за время τ;
K_1 — константа скорости гидролиза.

Интегрируя уравнение, получаем

$$-\ln (a - x) = K_1 \tau + \text{const}.$$

Учитывая, что в начальный момент времени $\tau = 0$ и $x = 0$, то $-\ln a = \text{const}$, следовательно,

$$\ln a - \ln (a - x) = K_1 \tau. \qquad (55)$$

Преобразуя это уравнение, получаем

$$x = a - ae^{-K_1\tau} = a\left(1 - e^{-K_1\tau}\right). \qquad (56)$$

Уравнение позволяет вычислить количество полисахарида x, гидролизованное за время τ. Количество негидролизованного полисахарида находится из уравнения

$$a - x = ae^{-K_1\tau}.$$

Величина $K_1\tau$ безразмерная, она называется **критерием гидролиза**. Этот показатель часто используется для характеристики различных режимов гидролиза.

Из уравнения (55) можно также вычислить значение константы скорости гидролиза:

$$K_1 = \frac{\ln a - \ln(a-x)}{\tau} = \frac{1}{\tau}\ln\frac{a}{a-x} = \frac{2{,}303}{\tau}\lg\frac{a}{a-x}.$$

Для того чтобы реакция гидролиза удовлетворяла уравнению первого порядка, необходимо, чтобы величина K_1 в различные промежутки времени при неизменных прочих факторах оставалась величиной постоянной. Величина этой константы зависит от многих факторов, основными из которых являются концентрация и активность катализатора, реакционная способность полисахарида, температура реакции. Представим эту константу как произведение четырех частных констант:

$$K_1 = \alpha N\delta\lambda, \qquad (57)$$

где α — относительная каталитическая активность кислоты;
N — нормальность кислоты, выраженная числом ее грамм-эквивалентов в 1 л раствора;
δ — относительный коэффициент устойчивости полисахарида к гидролизу;
λ — относительный коэффициент, характеризующий влияние на реакцию температуры.

Как же влияет каждый из этих факторов на скорость гидролиза полисахаридов в гомогенной среде? Реакцию гидролиза полисахаридов катализирует ион водорода, поэтому чем больше кислота диссоциирована, тем больше будет концентрация ионов водорода и тем быстрее будет протекать гидролиз.

Так, соляная кислота в водном растворе диссоциирует почти полностью. Условно принимая ее каталитическую активность за единицу, активность других кислот выразится следующими значениями α, рассчитанными:

1) по скорости гидролиза сахарозы при 25° С в растворах кислот с концентрацией 0,5*M*:

Кислота	α	Кислота	α
Хлористоводородная	1,000	Щавелевая	0,180
Азотная	1,000	Сернистая	0,150
Этилсерная	1,000	Фосфорная	0,060
Трихлоруксусная	0,750	Муравьиная	0,015
Серная	0,530	Уксусная	0,004

2) по скорости гидролиза целлюлозы 0,1 н. растворами кислот при 180° С:

Кислота	α	Кислота	α
Хлористоводородная	1,000	Фосфорная	0,080
Бромистоводородная	1,010	Муравьиная	0,025
Азотная	0,260	Уксусная	0,015
Серная	0,510		

При повышении температуры абсолютные значения диссоциации кислот несколько изменяются, но относительные значения α изменяются незначительно. Исключение составляют кислоты, которые при повышении температуры разлагаются, например азотная, трихлоруксусная и некоторые другие.

Второй сомножитель N (нормальность) в уравнении (57) не нуждается в дополнительных пояснениях.

Прочность гликозидных связей в полисахаридах определяется сомножителем δ.

Если принять за единицу гидролизуемость хлопковой целлюлозы как наиболее трудно гидролизуемого соединения, тогда относительные значения скоростей гидролиза других соединений будут больше единицы, например:

Полисахариды	δ
Целлюлоза хлопковая	1,0
Целлюлоза еловая	1,5
Ксилан хлопковой щелухи	200
Целлобиоза	130
Сахароза	130000

Четвертый член уравнения (57) λ определяет зависимость скорости гидролиза полисахарида от температуры, он находится эмпирически по изменению константы скорости гидролиза.

Приведенные выше уравнения гидролиза характеризуют гидролиз растворимых в воде полисахаридов, т. е

гомогенный катализ. Исследования, проведенные с целлюлозой и некоторыми другими полисахаридами, нерастворимыми в воде, показали, что процесс гетерогенного катализа также можно описать уравнением первого порядка.

Кинетика распада моносахаридов. Отдельные моносахариды в кислой среде распадаются с образованием различных продуктов. При этом от одной молекулы пентозы отщепляются 3 молекулы воды и возникает непредельный гетероциклический альдегид — фурфурол, который далее может разрушаться до муравьиной кислоты и гуминовых веществ (продуктов конденсации и полимеризации фурановых производных):

$$\underset{\text{Пентоза}}{\begin{matrix} H\diagdown\ \diagup OH \\ C \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H_2C- \end{matrix}\Big]O} \; -3H_2O \longrightarrow \underset{\text{Фурфурол}}{\begin{matrix} HC - CH \\ \| \quad\ \ \| \\ HC \quad C-CHO \\ \diagdown O \diagup \end{matrix}} \longrightarrow \underset{\text{Муравьиная кислота}}{HCOOH} + \text{Гуминовые вещества}$$

Отщепление от молекулы гексозы трех молекул воды приводит к образованию оксиметилфурфурола, который, разрушаясь, дает два стойких к нагреванию в присутствии кислот вещества: левулиновую и муравьиную кислоты:

$$\underset{\text{Гексоза}}{\begin{matrix} H\diagdown\ \diagup OH \\ C \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C-OH \\ | \\ H-C- \\ | \\ CH_2OH \end{matrix}\Big]O} \; -3H_2O \longrightarrow \underset{\text{Оксиметилфурфурол}}{\begin{matrix} HC - CH \\ \| \quad\ \ \| \\ H_2C-C \quad C \\ \diagdown O \diagup \end{matrix}} \longrightarrow \underset{\text{Муравьиная кислота}}{HCOOH} + \underset{\text{Левулиновая кислота}}{\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}} + \text{Гуминовые вещества}$$

Реакция распада моносахаридов при нагревании в разбавленных кислотах подчиняется кинетическому уравнению первого порядка. По аналогии с реакцией гидролиза полисахаридов можно записать:

$$\frac{dy}{d\tau} = K_2 (b - y),$$

где y — количество моносахарида, разложившееся за время τ;
b — исходное количество моносахарида;
K_2 — константа скорости распада моносахарида.

После интегрирования этого уравнения получаем

$$y = b \left(1 - e^{-K_2 \tau}\right).$$

Величина $K_2\tau$ называется **критерием распада моносахарида**.

Константу скорости распада можно представить в следующем виде:

$$K_2 = \alpha_1 N \delta_1 \lambda_1,$$

где α_1 — относительная каталитическая активность кислоты в реакции распада моносахарида;
N — нормальность кислоты в растворе;
δ_1 — относительный коэффициент устойчивости моносахарида к распаду;
λ_1 — частная константа, характеризующая зависимость реакции распада моносахарида от температуры.

Значения относительного коэффициента устойчивости моносахаридов по сравнению с устойчивостью глюкозы, для которой принята $\delta_1 = 1$ при 180° С в 0,8%-ной серной кислоте, следующие:

Моносахарид	δ_1	Моносахарид	δ_1
Глюкоза	1,0	Арабиноза	1,7
Галактоза	1,1	Ксилоза	3,0
Манноза	1,5	Фруктоза	1000,0

Каталитическая активность кислот примерно одинакова как при гидролизе полисахаридов, так и при распаде моносахаридов. Значения α_1 в 0,1 н. растворах кислот при температуре 180° С следующие:

Кислота	α_1	Кислота	α_1
Соляная	1,00	Фосфорная	0,11
Серная	0,50	Муравьиная	0,07
Азотная	0,23	Уксусная	0,06

Исследования показали, что значение коэффициента α_1 для серной кислоты непостоянно и зависит от ее концентрации в растворе: чем меньше концентрация серной кислоты, тем больше значение α_1.

Средний температурный коэффициент λ_1 для глюкозы с повышением температуры от 130 до 180° С постепенно падает с 2,9 до 1,7, а при распаде ксилозы в широкой области температур (140—210° С) остается почти постоянным и равным 2,2—2,3.

С увеличением степени гидролиза полисахаридов и повышением концентрации моносахаридов в гидролизате постепенно увеличивается количество продуктов распада моносахаридов. Такое увеличение содержания продуктов распада в гидролизате объясняется параллельным течением в растворе кислоты реакции реверсии моносахаридов.

При длительном нагревании продукты распада моносахаридов переходят в окрашенные продукты — карамеланы — и далее в гуминовые вещества. При обычной концентрации моносахаридов (3—5%) эта реакция протекает почти незаметно. Количество моносахарида, образовавшееся за время τ, вычисляется по формуле (56).

Если моносахарид разлагается, образуя продукты распада сахара, то связь между количеством разложившегося моносахарида и количеством образовавшихся продуктов распада можно выразить дифференциальным уравнением

$$\frac{dy}{d\tau} = K_2 (x - y). \tag{58}$$

Подставляя в уравнение (58) значение x из уравнения (56), получаем следующее выражение:

$$\frac{dy}{d\tau} + K_2 y = K_2 a \left(1 - e^{-K_1 \tau}\right).$$

Решая его относительно y, получаем

$$y = \frac{a}{K_2 - K_1} \left(K_2 e^{-K_1 \tau} - K_1 e^{-K_2 \tau}\right). \tag{59}$$

Уравнение (59) позволяет вычислить количество продуктов распада сахаров, образующихся при гидролизе

полисахарида в любой период времени от начала реакции. Действительное количество сахара z, образующееся в данный момент времени τ, можно найти из разности

$$z = x - y, \tag{60}$$

а общее уравнение выхода сахара после подстановки в уравнение (60) значения x из уравнения (56) и y из уравнения (59) приобретает следующий вид:

$$z = \frac{\mu_a K_1}{K_2 - K_1}\left(e^{-K_1\tau} - e^{-K_2\tau}\right),$$

где μ_a — коэффициент пересчета полисахаридов в моносахариды.

Рассчитывая выход сахара при гидролизе растительной ткани, необходимо учитывать неоднородность присутствующих полисахаридов и для каждого из них экспериментально устанавливать свои константы.

Для различных растительных тканей, имеющих различный состав полисахаридов, значения констант неодинаковы. Величины констант в каждом случае устанавливаются экспериментально.

Основные стадии обработки гидролизата для культивирования микроорганизмов

Кислый гидролизат после инверсии, имеющий температуру около 100° С, характеризуется примерно следующим составом (в %): общее содержание РВ 2,5—3,5, в том числе гексоз — 70—80, пентоз — 30—20; несахара — 0,10—0,16; серная кислота — 0,5—0,6; органические кислоты — до 0,40; фурфурол — 0,05—0,06; оксиметилфурфурол — до 0,20.

При использовании гидролизата для последующего выращивания микроорганизмов необходимо возможно более полно удалить из него вещества, угнетающе действующие на развитие дрожжей.

Основные стадии обработки гидролизата включают следующие операции: освобождение от серной кислоты (нейтрализацию), удаление коллоидных взвешенных частиц, осадка, выпадающего при нейтрализации на стадии отстаивания, уменьшение содержания фурфурола, охлаждение, аэрирование, вторичное отделение оставшейся коллоидной взвеси.

Аппаратурно-технологическая схема обработки гидролизата приведена на рис. 46.

Нейтрализация. Серная кислота из гидролизатов удаляется наиболее простым способом — оттитровыванием (нейтрализацией) ее известковым молоком и аммиачной водой.

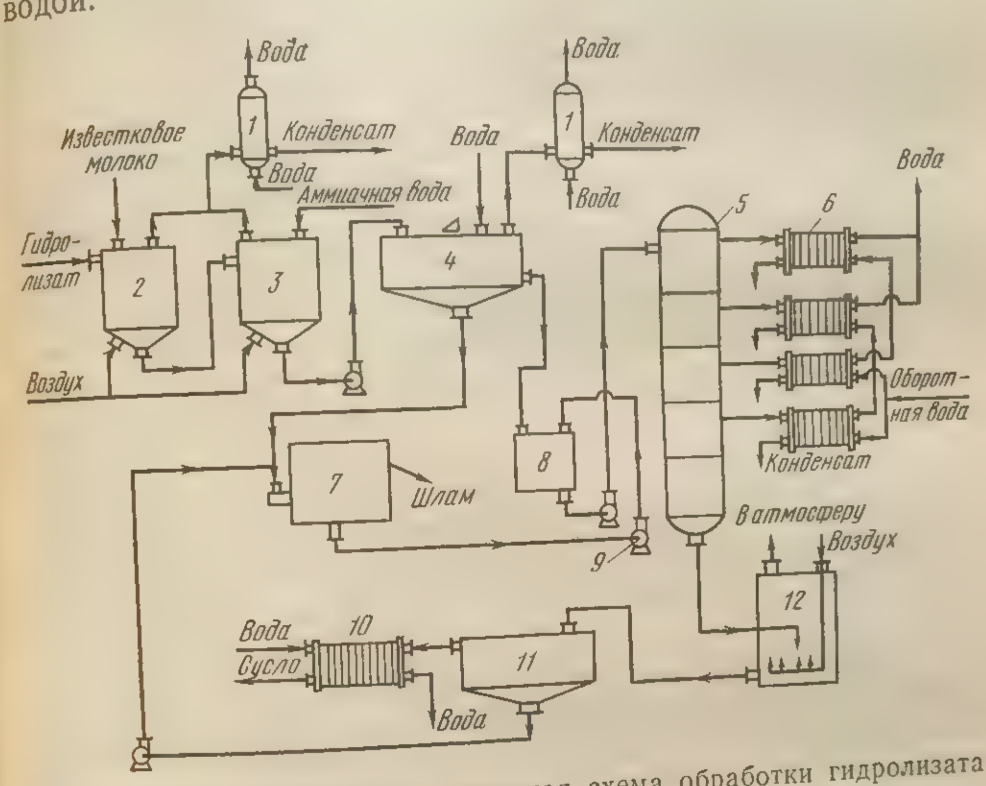


Рис. 46. Аппаратурно-технологическая схема обработки гидролизата перед подачей в дрожжерастильный аппарат:

1 — теплообменник; 2 — нейтрализатор; 3 — выдерживатель; 4 — отстойник; 5 — вакуум-охладительная установка; 6 — конденсатор; 7 — фильтр пресс ФПАКМ; 8 — сборник нейтрализата; 9 — насос; 10 — теплообменник; 11 — отстойник; 12 — аэратор.

При нейтрализации известковым молоком реакция идет по уравнению

$$H_2SO_4 + Ca(OH)_2 = \downarrow CaSO_4 + 2H_2O.$$

Гипс, образующийся в результате этой реакции, плохо растворим, поэтому он выпадает в осадок и после отстаивания раствора удаляется.

При нейтрализации аммиачной водой образуется сульфат аммония, который в концентрации, используемой в производстве, полностью растворим в воде:

$$H_2SO_4 + 2NH_4OH = (NH_4)_2SO_4 + 2H_2O.$$

Нейтрализация аммиачной водой имеет, несомненно, преимущества перед нейтрализацией известковым молоком: не требуется специального оборудования для удаления гипса; аммиачную воду можно подавать во всасывающую линию насоса, откачивающую гидролизат; образующийся сульфат аммония может использоваться дрожжами в качестве источника азота. Однако на практике во избежание дополнительных затрат на закупку и транспортировку аммиака используется местное сырье — известь. При нейтрализации известью для предупреждения гипсоциации оборудования и трубопроводов концентрация гипса в растворе не должна превышать 0,19—0,22%. Это достигается применением гипсовой затравки в виде мелких кристаллов с большой относительной поверхностью, получаемых в результате реакции

$$(NH_4)_2SO_4 + Ca(OH)_2 = 2NH_4OH + \downarrow CaSO_4,$$

а при отсутствии сульфата аммония — по реакции нейтрализации.

Гипсовая затравка подается в нейтрализатор одновременно с известковым молоком. На 1 $м^3$ гидролизата необходимо задать в известковое молоко 0,25 г $(NH_4)_2SO_4$.

Независимо от вида нейтрализующего агента кислый гидролизат доводится до pH 3,2—5,4. При этом обязательным условием является полная нейтрализация свободной серной и муравьиной кислот (pH 3,0—3,2). Обычно серную и муравьиную кислоты нейтрализуют известью, а остальные органические кислоты — аммиаком. Теоретически на 100 кг серной кислоты расходуется 75,5 кг гидрата окиси кальция, при этом образуется 138,8 кг сернокислого кальция.

Процесс нейтрализации проводится в специальных аппаратах — нейтрализаторах (рис. 47). Как правило, для проведения процесса устанавливается 2—3 таких аппарата, соединенных последовательно. В первом аппарате идет собственно процесс нейтрализации, в остальных — доведение pH до требуемого и формирование кристаллов гипса. Для поддержания кристаллов гипса и частиц лигнина во взвешенном состоянии жидкость в нейтрализаторах постоянно перемешивается. При недостаточном перемешивании наблюдается местное перещелачивание жидкости, что вызывает разрушение моносахаридов.

Отстаивание. Нейтрализат температурой 80—85° С, содержащий взвешенные частицы гипса и органических веществ (лигнин, скоагулированные гуминовые и смолистые вещества), поступает (см. рис. 46) в отстойник (рис. 48). Содержание взвешенных частиц в нейтрализате (в г/л): хвойной древесины—5—7, лиственной древесины — до 10, подсолнечной лузги и кукурузной кочерыжки — до 12. Взвешенные частицы состоят на 70—80% из гипса и на 20—30% из органических веществ. Скорость осаждения зависит от размера и плотности частиц. При прочих равных условиях скорость осаждения гипса выше скорости осаждения лигнина. После отстаивания нейтрализат содержит взвешенных частиц 0,5—0,8 г/л, 80% которых составляют органические вещества.

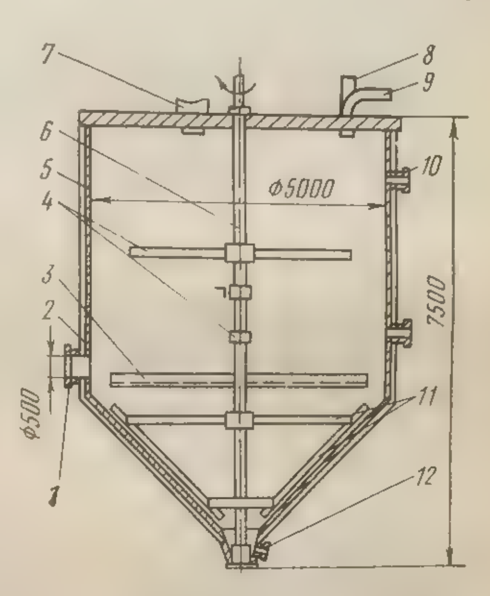


Рис. 47. Нейтрализатор с коническим днищем:

1 — лаз; *2* — стальной корпус; *3* — лопасти контрмешалки; *4* — лопасти мешалки; *5* — футеровка; *6* — вал мешалки; *7* — вытяжная труба; *8* — штуцер для подачи известкового молока; *9* — штуцер для подачи гидролизата; *10* — штуцер для подачи нейтрализата из головного нейтрализатора; *11* — лопасти рамной мешалки; *12* — штуцер для отвода нейтрализата.

Охлаждение. Из отстойника нейтрализат поступает в промежуточную емкость (см. рис. 46), а оттуда насосом передается на охлаждение в пластинчатые теплообменники или вакуум-охладительные установки (рис. 49). В дрожжевом производстве рекомендуется применять вакуум-охлаждение, при котором в результате самоиспарения из нейтрализата удаляется 5—7% воды и дополнительное количество вредных летучих примесей, в частности фурфурол и оксиметилфурфурол.

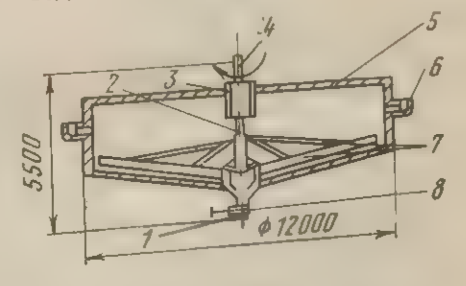


Рис. 48. Отстойник:

1 — устройство для выгрузки шлама; *2* — вал; *3* — распределительный барабан; *4* — приводной механизм; *5* — корпус; *6* — кольцевой желоб для выпуска осветленного нейтрализата; *7* — выгребное устройство; *8* — запорная задвижка.

Применяемые в гидро-

лизной промышленности вакуум-охладительные установки различны по конструкции, типу используемых конденсаторов, взаимному расположению вакуум-испарителей. Глубина вакуума возрастает по пути движения нейтрализата от испарителя к испарителю, разность давлений поддерживается автоматически. В случае, если на вакуум-охладительной установке не удается охладить нейтрализат до требуемой температуры (25—30° C), его дополнительно охлаждают на поверхностных теплообменниках.

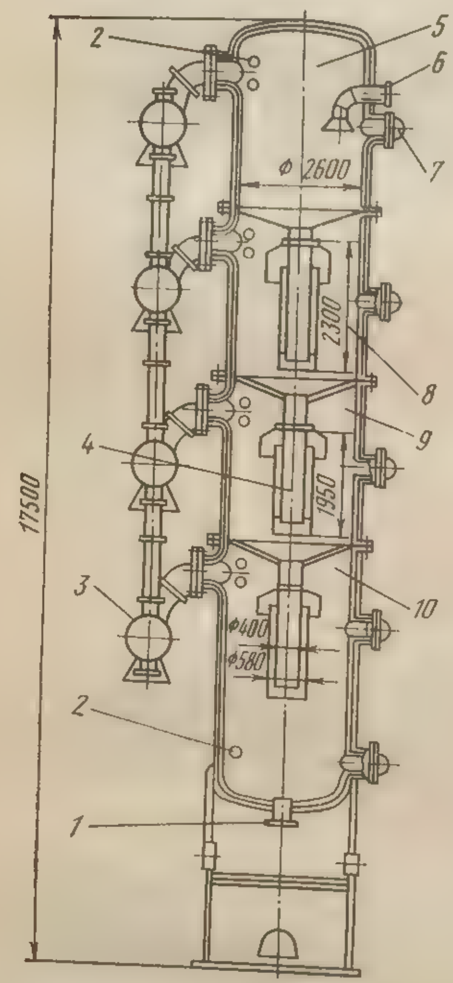


Рис. 49. Вакуум-охладительная установка:

1 — штуцер для выхода охлажденного нейтрализата; *2* — штуцер для термометра сопротивления; *3* — конденсатор (для каждой ступени свой); *4* — переточная труба с гидрозатвором; *5, 8, 9, 10* — испарители соответственно I, II, III и IV ступеней; *6* — штуцер для ввода горячего нейтрализата; *7* — лаз.

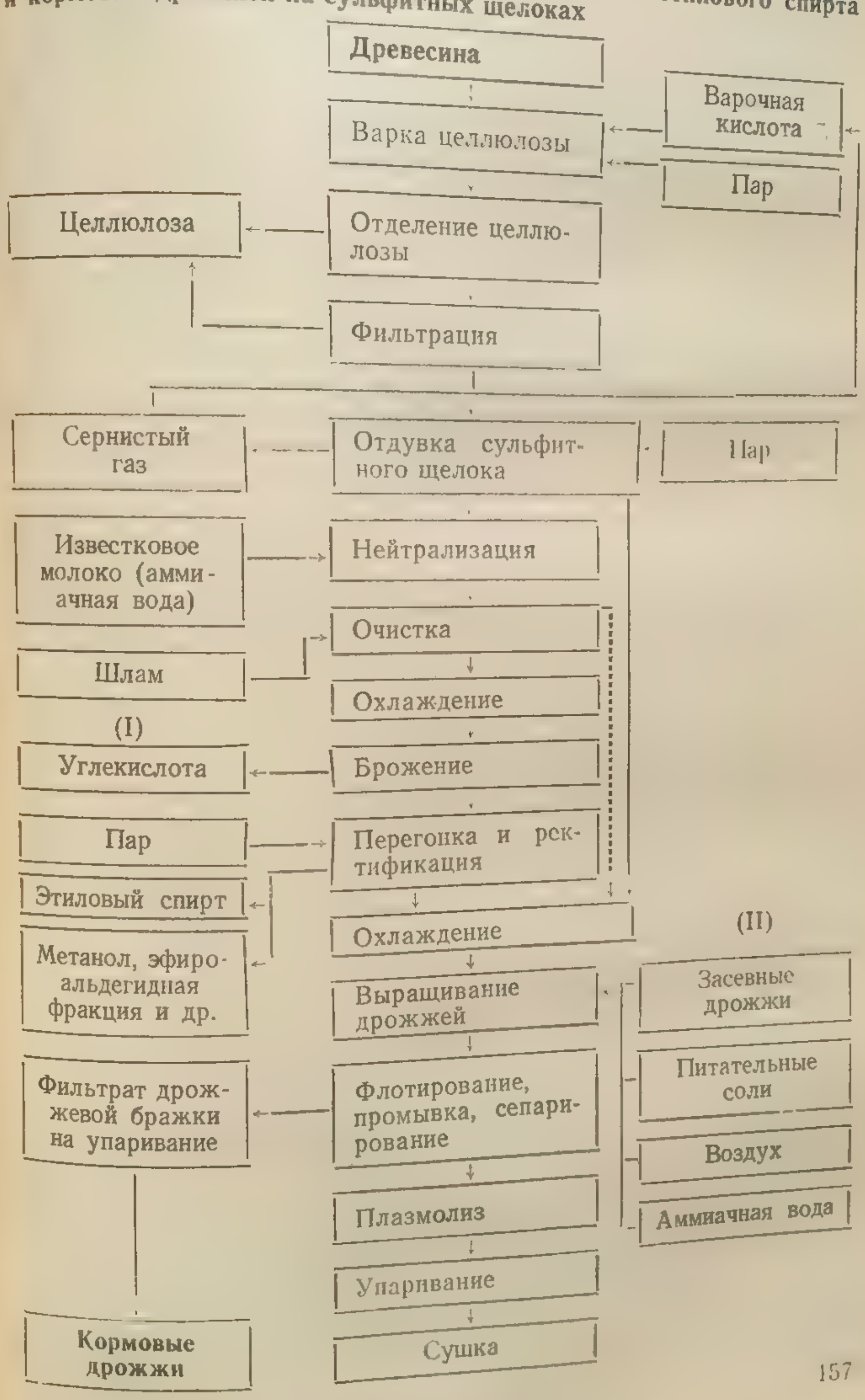
Получение предгидролизатов и сульфитных щелоков

Для производства кормовых дрожжей широко применяются отходы целлюлозных предприятий: сульфитный щелок и предгидролизаты.

Сульфитный щелок. На сульфитно-целлюлозных заводах, вырабатывающих целлюлозу, в качестве неизбежных побочных продуктов получают сульфитные щелоки и щелоки от горячего «облагораживания» целлюлозы, которые ввиду их большой загрязненности нельзя присоединять к сточным водам.

В процессе варки целлюлоза как конечный продукт производства остается нетронутой, а в раствор сульфитного щелока переходят лигнин, гемицеллюлозы, смолы, жиры, минеральные соли. Кроме того, щелок содержит моносахариды, получаемые в основном при гидролизе гемицеллюлоз. На основе переработки сульфит-

Схема 4. Основные стадии процесса производства этилового спирта и кормовых дрожжей на сульфитных щелоках



ных щелоков можно получать этиловый спирт и кормовые дрожжи или только кормовые дрожжи (схема 4).

При переработке 1 т абсолютно сухой древесины по схеме 4(I) получается 35—45 л этилового спирта, 1 кг метилового спирта, 20—25 кг жидкой углекислоты и 15 кг кормовых дрожжей, в то время как при переработке по схеме 4 (II) этилового и метилового спиртов, углекислоты не образуется, а выход кормовых дрожжей составляет 50—60 кг.

Предгидролизаты. Образуются при водном или кислотном гидролизе гемицеллюлоз древесины и состоят из пентозного сахара и декстринов. Перед биохимической переработкой предгидролизаты подвергают инверсии — гидролизу полисахаридов в водном растворе минеральной кислоты при соответствующей температуре. Впервые в мире промышленное производство кормовых дрожжей на предгидролизатах организовано на Братском лесопромышленном комплексе.

Схема обработки предгидролизатов для биохимической переработки аналогична схеме обработки гидролизатов, поэтому нет необходимости на ней подробно останавливаться.

Характеристика сульфитных щелоков

Сульфитный щелок, который ранее являлся неутилизируемым отходом целлюлозного производства, сейчас представляет собой один из источников сырья при получении кормовых дрожжей, этилового и метилового спиртов и др.

Химический состав сульфитных щелоков зависит от вида используемого сырья, режима варки, выхода целлюлозы и других факторов.

Например, при варке целлюлозы из древесины лиственных пород получаются щелоки с низким содержанием РВ и высоким — пентоз. Поэтому эти щелоки нецелесообразно использовать для производства этилового спирта. Их направляют на переработку для получения кормовых дрожжей по схеме 4 (II) без предварительной утилизации гексозного сахара на спирт.

Использование для спиртовой и дрожжевой промышленности щелоков, получаемых на некальциевых основаниях, требует дополнительного «облагораживания» щелока путем продувки паром и воздухом.

Для получения кормовых дрожжей могут быть использованы все виды сульфитных щелоков, но в каждом слу-

чае требуется соответствующая их подготовка. Чтобы иметь представление об особенностях сульфитных щелоков, необходимо коротко остановиться на процессе получения целлюлозы.

Варка целлюлозы проводится в варочной кислоте при температуре 140—160° С и соответствующем давлении. Варочная кислота представляет собой смесь бисульфита кальция и свободной сернистой кислоты. Являясь слабой кислотой, сернистая кислота незначительно диссоциирует на ионы H^+ и HSO_3^- ($K_{дисс} = 1{,}7 \cdot 10^{-2}$), $2H^+$ и SO_3^{2-} ($K_{дисс} = 1{,}0 \cdot 10^{-7}$).

При повышении температуры сернистая кислота в значительной степени переходит в молекулярно растворенный сернистый ангидрид, поддерживая равновесие с кислотой:

$$H_2SO_3 \rightleftarrows SO_2 + H_2O.$$

Бисульфит кальция в растворе почти полностью диссоциирован на ионы:

$$Ca(HSO_3)_2 \rightleftarrows Ca^{2+} + 2HSO_3^-.$$

В общем виде варочная кислота при высокой температуре представляет сложную равновесную систему:

$$2SO_2 + 2H_2O \rightleftarrows 2H_2SO_3 \rightleftarrows 2HSO_3^- + 2H^+$$

$$\downarrow\uparrow Ca^{2+}$$

$$CaCO_3 + H_2SO_4 \rightleftarrows Ca(HSO_3)_2.$$

Сернистый ангидрид как в газовой фазе, так и в водном растворе легко окисляется кислородом воздуха:

$$2SO_2 + O_2 \rightarrow 2SO_3.$$

В водном растворе параллельно наблюдается автокаталитическое окисление, ускоряющее образование серы:

$$3H_2SO_3 \rightarrow 2SO_4^{2-} + 2H^+ + S + H_2O.$$

Подобным образом происходит окисление кислородом бисульфита кальция:

$$Ca(HSO_3)_2 + O_2 \rightarrow 2CaSO_4 + 2H_2SO_3.$$

При автокаталитическом окислении процесс может быть описан в ионной форме уравнением

$$2HSO_3^- \rightarrow 2SO_4^{2-} + H^+ + S + H_2O.$$

Как видно из приведенных уравнений, при взаимодействии серного ангидрида с водой в варочной кислоте неизбежно образуется серная кислота. Присутствие свободной серной кислоты может привести к значительным потерям целлюлозы за счет ее гидролиза. Поэтому связывание серной кислоты проводят еще на стадии получения варочной кислоты реакцией нейтрализации с катионом бисульфита, при этом катион бисульфита рассматривается как нейтрализующий агент. Он получил название **основания варочной кислоты** и выражается условно в виде суммы оснований MgO, CaO, Na_2O, $(NH_4)_2O$.

Дозировки различных оснований выражаются в пересчете на SO_2, называемый в этом случае связанным. Так как присутствующий в варочной кислоте бисульфит можно представить как смесь моносульфита и сернистой кислоты $[Ca(HSO_3)_2 \rightleftarrows CaSO_4 + H_2SO_4]$, связанный SO_2 представляет собой сернистый ангидрид, находящийся в моносульфите, а свободный SO_2 — сумму растворенного SO_2 и половины SO_2, находящегося в бисульфите. Сумма связанного и свободного SO_2 составляет весь SO_2 варочной кислоты.

В зависимости от состава варочной кислоты различают следующие **виды сульфитных варок:** моносульфитная, бисульфитная и кислая бисульфитная. Для микробиологической переработки в спиртовом и дрожжевом производствах используют сульфитные щелоки двух последних варок.

Бисульфитная варка — это варка, при которой pH среды около 4,0 и весь сернистый ангидрид находится в варочной кислоте в виде бисульфита без избытка SO_2.

Кислая бисульфитная варка — это варка, при которой в варочной кислоте вместе с бисульфитом имеется значительный избыток SO_2; pH среды около 1,0—1,5.

Применяемые в настоящее время варианты сульфитных варок подразделяются на одно- и двухступенчатые.

Сульфитная целлюлоза в зависимости от режима варки и выхода подразделяется на целлюлозу нормального выхода (до 50% от массы древесины), целлюлозу высокого выхода (до 65%) и полуцеллюлозу (70—75%-ного выхода). С увеличением выхода целлюлозы снижается содержание сахаров в сульфитном щелоке. Например, при варке целлюлозы нормального выхода содержание сахаров в щелоке составляет 15—16% от массы хвойной древесины; при варке целлю-

лозы высокого выхода — 12—13%, при этом за счет дополнительного гидролиза (инверсии) выход РВ повышается на 10%.

В зависимости от вида перерабатываемого сырья сульфитные щелоки при варке целлюлозы нормального выхода различаются по составу:

щелоки хвойных пород древесины содержат в основном гексозы (маннозу, глюкозу, галактозу) и могут использоваться для получения как спирта, так и кормовых дрожжей;

щелоки лиственной древесины в основном содержат пентозы, среди которых ксилоза составляет до 85%, и используются только для получения кормовых дрожжей.

Содержание моносахаридов в сульфитном щелоке, определяемое по РВ, при расчете на общее содержание легкогидролизуемых полисахаридов в древесине составляет 20—25%, практически выход только 12—16%, остальное количество сахаров теряется вследствие их разложения.

При кислотном распаде пентоз во время сульфитной варки целлюлозы из лиственных пород древесины образуется повышенное количество фурфурола. Особенно оно увеличивается при понижении выхода целлюлозы, т. е. при более глубокой варке.

Потери сахаров можно снизить уменьшением длительности варки, применяя в качестве основания варочной кислоты некальциевые соединения: MgO, Na_2O, $(NH_4)_2O$.

Потери сахаров в результате распада возрастают с повышением температуры варки (повышение температуры на 1° C приводит к увеличению распада глюкозы на 1%).

Способы отбора сульфитных щелоков

При сульфитной варке целлюлозы в варочных котлах большой вместимости получается от 6,5 до 8 м^3 сульфитного щелока на 1 т целлюлозы. При этом щелок находится в варочном котле в двух состояниях: свободном (вне волокна) и связанном (внутри волокна целлюлозы). Свободный (крепкий) щелок, стекая, легко отделяется от массы целлюлозы под давлением 0,2—0,3 МПа. Содержание свободного щелока составляет 50—60% от общего. Остальное количество щелока находится в полостях волокна и клеточных стенках и отделяется только

диффузией. Многократная промывка волокнистой массы водой вызывает заметное разбавление щелока. Отбор всего сульфитного щелока из варочного котла значительно увеличивает длительность оборота варочных котлов за счет непроизводительного времени на стекание щелока, вытеснения его водой и ступенчатой промывки.

Наиболее эффективным для целлюлозных заводов является ступенчатый способ отбора щелока. По этому

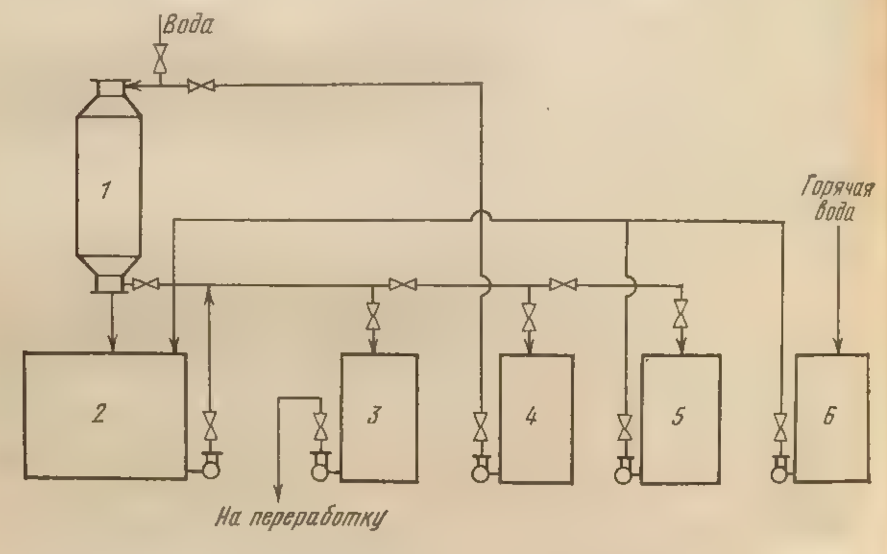
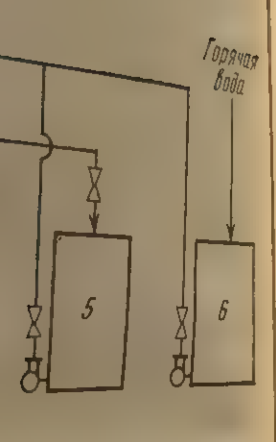


Рис. 50. Схема отбора сульфитного щелока ступенчатым способом:

1 — варочный котел; 2 — сцежа; 3 — сборник крепкого щелока; 4 — сборник первого оборотного щелока; 5 — сборник второго оборотного щелока; 6 — сборник горячей воды.

способу крепкий щелок, полученный при варке целлюлозы, направляется в сборник крепкого щелока *3* (рис. 50) или непосредственно в сульфитно-спиртовой цех завода. После отбора свободностекающей части щелока для промывки массы целлюлозы в котел *1* подается первый оборотный щелок, вытесняющий щелок, находящийся между волокнами целлюлозы. В результате этих операций — свободного стекания и вытеснения щелока первым оборотным щелоком из сборника *4* за счет неравномерного распределения сырья в котле, наличия ходов, образующихся в результате циркуляции жидкости, — можно отобрать без разбавления 50% щелока.

После окончания отбора крепкого щелока масса вымывается в сцежу *2*, куда подается второй оборотный



щелок из сборника 5. Из смытой в сцежу массы через ложное дно также отделяется часть крепкого щелока, поступающего в сборник 3 или 4. Промывают массу в сцежах горячей водой из сборника 6, образующийся при этом слабый щелок перекачивается в сборник 5. По этой схеме можно отобрать не менее 90% щелока при разбавлении его всего на 15—18%.

Более высокая степень отбора щелока при наименьшем его разбавлении достигается при использовании сгустителей и вакуум-фильтров.

Подготовка сульфитных щелоков к выращиванию микроорганизмов

Использование сульфитных щелоков для выращивания кормовых дрожжей требует дополнительной обработки ввиду высокой кислотности щелоков, присутствия остаточных количеств олигосахаридов, волокон целлюлозы и различных сернистых соединений.

Схема дополнительной подготовки сульфитного щелока включает следующие технологические операции: инверсию олигосахаридов, отделение волокон целлюлозы фильтрованием, десульфитацию продувкой воздухом и паром для удаления летучих соединений, нейтрализацию, очистку, осветление и обогащение питательными солями. Принципиальная схема подготовки сульфитных щелоков к выращиванию микроорганизмов представлена на рис. 51.

Инверсия. При варке в мягких условиях целлюлозы высокого выхода и полуцеллюлозы, а также сульфитной вискозной, или кордной, целлюлозы гидролиз гемицеллюлоз не проходит до конца и в сульфитном щелоке и предгидролизате содержатся олигосахариды — продукты неполного гидролиза гемицеллюлоз. Цель инверсии — провести дополнительный гидролиз этих олигосахаридов.

Возможно проведение процесса инверсии двумя путями: под давлением при температуре 130—140° С и открытым способом при температуре около 100° С. Инверсия под давлением более эффективна, так как требует емкостей меньшего объема и меньшего расхода кислот.

Процесс инверсии предгидролизатов аналогичен инверсии сульфитных щелоков и подчиняется тем же закономерностям. Однако присутствие в предгидролизатах

значительного количества смолы, оседающей на стенках оборудования и трубопроводов, исключает возможность проведения этого процесса открытым способом. В результате инверсии содержание усваиваемых микроорганизмами сахаров в предгидролизатах увеличивается в 1,7—2,0 раза.

В перспективе возможно проведение процесса гидролиза олигосахаридов ферментативным путем с помощью

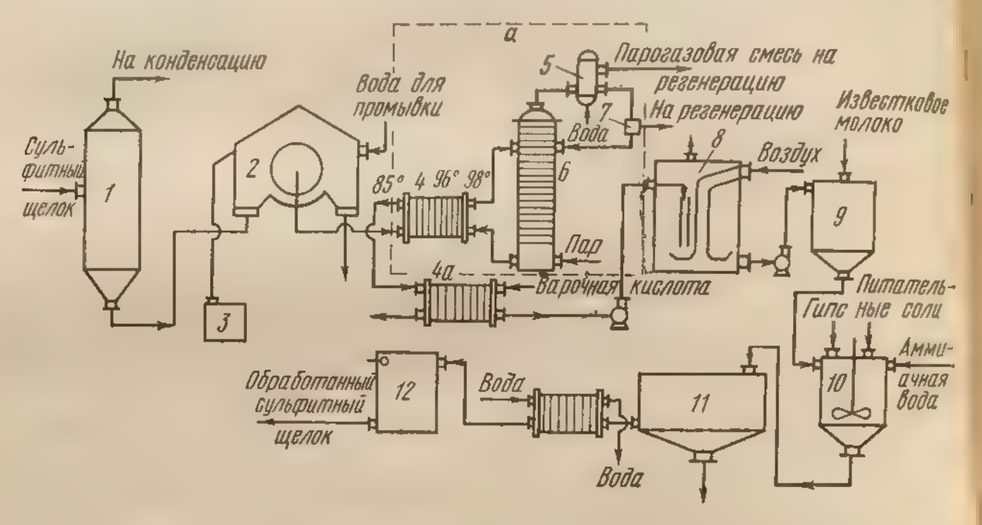


Рис. 51. Схема обработки щелока перед подачей в дрожжерастильный чан:

1 — инвертор; 2 — вакуум-фильтр; 3 — сборник волокон целлюлозы; 4 (4а) — теплообменник; 5 — дефлегматор; 6 — барботажная колонна; 7 — делительный стакан; 8 — аэратор; 9 — нейтрализатор; 10 — выдерживатель; 11 — отстойник; 12 — сборник подготовленного щелока.

гемицеллюлазных ферментных препаратов микробного происхождения.

Отделение волокон целлюлозы фильтрованием. Волокна целлюлозы, остающиеся в сульфитном щелоке, оказывают неблагоприятное влияние на процесс выращивания дрожжей и забивают аппаратуру. Допустимое содержание волокна в щелоке — не более 0,05 г, при большем содержании щелок необходимо очищать. Для очистки используются фильтрующие устройства различного типа: открытые фильтрующие сетки, открытые сита (вибросита), закрытые барабанные сита и др. Наиболее простым фильтрующим устройством является стационарный наклонный ситчатый фильтр. Более совершенным средством для фильтрования являются наклонные (под углом

12°) вибросита с частотой колебаний 1200 мин$^{-1}$. Они позволяют снизить содержание целлюлозного волокна в щелоке с 0,4 до 0,1 г/л.

Но открытые сита имеют существенный недостаток — значительное охлаждение сульфитного щелока в процессе фильтрации, приводящее к большим потерям тепла, которое необходимо восполнять при проведении процессов десульфитации. Закрытые барабанные фильтры имеют преимущества перед открытыми ситами, так как позволяют проводить процесс фильтрации без потерь тепла.

Десульфитация щелока продувкой воздухом. В состав сульфитного щелока входит свободный молекулярно-растворимый SO_2, который в процессе биохимической подготовки щелоков к культивированию микроорганизмов вступает в реакцию с сахарами, снижая выход дрожжей. Одним из простых способов удаления SO_2 является продувка сульфитного щелока воздухом в варочных котлах и сборниках. Эффективность продувки изменяется в зависимости от характера получаемой целлюлозы и концентрации связанного SO_2.

Так, при получении целлюлозы высокого выхода в сульфитном щелоке остается значительное количество неиспользованного основания, связывающего SO_2 в нелетучие соединения.

Степень удаления SO_2 зависит от температуры щелока. Продувка щелока воздухом при температуре не ниже 80° С позволяет удалять максимальное количество SO_2. Снижение температуры до 50° С и ниже делает процесс продувки практически бесполезным, так как с понижением температуры повышается растворимость SO_2.

Десульфитация отдувкой паром. Наилучшим способом удаления соединений SO_2 является барботажная продувка щелока паром, проводимая в специальных аппаратах, имеющих развитую поверхность контакта между щелоком и паром. В качестве таких аппаратов используются тарельчатые или насадочные колонны.

На рис. 51 (фрагмент *а*) показано, как щелок температурой 90—92° С из барабанного вакуум-фильтра *2* подается на теплообменник *4* для нагрева до температуры 98—100° С теплом, выходящим из колонны продутого щелока. Из подогревателя щелок поступает в верхнюю часть колонны *6* и оттуда стекает по тарелкам.

Для удаления SO_2 из щелока в нижнюю часть колонны подается острый пар, который, поднимаясь по колонне, насыщается летучими веществами, извлекаемыми из щелока. С верхней тарелки парогазовая смесь уходит в дефлегматор *5*, где частично при подаче холодной воды конденсируется, и в виде флегмы возвращается на верхнюю тарелку колонны. Часть флегмы через делительную емкость 7 может быть отобрана в виде конденсата, содержащего SO_2 и другие летучие вещества, и подана на регенерацию.

Так как обработанный паром щелок имеет сравнительно высокую температуру (80—85° С), то для вторичного использования тепла целесообразно через специальный теплообменник — подогреватель *4а* пропустить варочную кислоту, поступающую на варку, для нагрева. Охлажденный, обработанный паром щелок насосом направляется на последующие операции.

Окисление сульфитов кислородом воздуха. При обработке некальциевых сульфитных щелоков отдувка паром в колонне оказывается недостаточной для снижения суммарного содержания соединений SO_2 до допустимых пределов. В этих щелоках содержится значительное количество растворимых сульфитов, не отделяемых с паром. Избыточное количество этих сульфитов переводится в растворимые сульфаты, безопасные для дальнейшей обработки щелока окислением кислородом воздуха.

Степень окисления сульфитов в сульфаты зависит от температуры щелока, например при уменьшении температуры с 85 до 20° С количество окислившегося сульфита снижается в 3 раза.

Реакция окисления сульфитов кислородом воздуха протекает в области pH, зависящего от природы основания варочной кислоты и определяющего растворимость сульфитов и их комплексов с молекулами сахара. Для обеспечения не только полного окисления растворимых сульфитов, но и осаждения сульфата кальция, присутствующего в любом щелоке независимо от природы основания, pH сульфитного щелока не должен превышать 3,5.

Процесс окисления проводится в специальном аппарате *8* (см. рис. 51), воздух в который подается снизу через эрлифтную или барботажную системы.

Нейтрализация. Сульфитный щелок, получаемый при варке целлюлозы нормального выхода, после десульфитации и окисления имеет pH 3,5—4,0 и может непосредственно подаваться на выращивание микроорганизмов без специальной нейтрализации и очистки. При использовании сульфитного щелока, полученного при варке целлюлозы высокого выхода и полуцеллюлозы с варочной кислотой на растворимых основаниях, проведение процесса нейтрализации необходимо.

Наиболее распространенным нейтрализующим агентом является известковое молоко, реже используют окись магния и аммиачную воду.

Процесс нейтрализации может быть проведен в нейтрализаторах-смесителях *9* (см. рис. 51), имеющих дисковые распылители для тонкого диспергирования известкового молока и капельного контактирования со щелоком. Для созревания и выпадения кристаллов сульфата ($CaSO_4$) и сульфита ($CaSO_3$) смесь поступает в емкости-выдерживатели *10* с перемешиванием (механическим или воздухом).

Очистка. В зависимости от размера частиц солей, выпадающих при нейтрализации, могут быть применены различные методы очистки: отстаивание, очистка на гидроциклонах или фильтрах различных конструкций.

На заводах для этой цели используются обычные отстойники, оснащенные выгребными устройствами. Для интенсификации процесса очистки сульфитного щелока вместо отстойников могут применяться гидроциклоны. Возможность применения гидроциклонов обусловлена более крупными размерами частиц шлама при нейтрализации сульфитных щелоков по сравнению с гидролизатами. Для повышения эффективности работы гидроциклонов необходимо поддерживать разность давлений на входе и выходе нейтрализата не менее 0,20—0,25 МПа. Присутствие повышенного количества волокон целлюлозы исключает применение гидроциклонов.

Обогащение питательными солями. При использовании сульфитного щелока и предгидролизата для непосредственного выращивания дрожжей (без получения этилового спирта) часть питательных солей (аммофос, представляющий смесь двух солей — суперфосфата и сульфата аммония) подается в нейтрализатор *9* и вы-

держиватель *10* (см. рис. 51), а остальные соли (сульфат аммония или аммиачная вода, хлористый калий) — непосредственно в дрожжерастильный аппарат.

При использовании для получения кормовых дрожжей послеспиртовой сульфитной барды все питательные соли подаются в сборник-отстойник горячей барды.

Охлаждение. Сульфитный щелок, предгидролизат или послеспиртовая барда, так же как и гидролизат, перед подачей на выращивание дрожжей должны быть охлаждены до определенной температуры (26—27° С). Для этого в настоящее время широко применяются вакуум-охладительные установки, спиральные и пластинчатые теплообменники.

§ 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГИДРОЛИЗАТАХ, СУЛЬФИТНЫХ ЩЕЛОКАХ И ПРЕДГИДРОЛИЗАТАХ

Скорость накопления биомассы и ее высокие качественные показатели во многом зависят от строгого соблюдения режимов культивирования, а главное — от физиологических возможностей самой культуры микроорганизма.

При производстве белковых препаратов на гидролизатах растительного сырья, сульфитных щелоках и других субстратах используются разнообразные культуры микроорганизмов. Штаммов микроорганизмов — продуцентов белка очень много и на каждом предприятии в микробиологической лаборатории отбирают и селекционируют адаптированные к данному сырью и условиям культивирования микроорганизмы, которые функционируют как производственные перспективные штаммы.

Большое значение имеет и экспериментально обоснованный состав питательных солей, вносимых в среды для выращивания микроорганизмов. Не менее важны обработка гидролизатов и сульфитных щелоков, освобождение их от токсических веществ и рациональный выбор условий культивирования микроорганизмов: температуры, скорости подачи питательных веществ, pH среды, аэрации и т. д.

Характеристика гидролизатов и сульфитных щелоков как субстратов для выращивания микроорганизмов

Состав гидролизатов. Входящие в состав гидролизата вещества можно разделить на две большие группы: минеральные и органические.

Минеральные вещества имеют различное происхождение. В их число входят минеральная кислота, употребляемая при гидролизе как катализатор, а также зольные элементы растительной ткани. В составе древесины содержится обычно от 0,2 до 1,2% зольных веществ. При гидролизе они переходят в раствор в виде соответствующих солей (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn и др.). Из анионов, перешедших в раствор, встречаются PO_4^{2-}, SO_4^{2-} а также окись кремния.

Органические вещества гидролизата включают летучие и нелетучие соединения.

К летучим веществам относятся терпены, метиловый спирт, фурфурол, муравьиная и уксусная кислоты. Большинство из них являются продуктами распада моносахаридов, проходящего параллельно с гидролизом полисахаридов. При этом гексозы распадаются с образованием оксиметилфурфурола, левулиновой и муравьиной кислот. Пентозы разлагаются с образованием фурфурола, муравьиной кислоты и гуминовых веществ.

Нелетучие органические вещества гидролизата делятся на моно- и полисахариды, органические кислоты, лигно-гуминовые вещества, смолы, жиры.

Состав и содержание гидролизатов (в %), получаемых из различного растительного сырья, приведен в табл. 7.

Таблица 7

Вид сырья (древесина)	РВ	Декстрины	Бромируемые вещества	Фурфурол	Оксиметилфурфурол	Формальдегид	Органические кислоты		
							уксусная	муравьиная	нелетучие
Ель	3,16	0,18	0,37	0,04	0,06	0,008	0,25	0,03	0,15
Береза	2,88	0,15	0,54	0,08	0,09	0,006	0,40	0,05	0,24

В состав моносахаридов гидролизатов входят гексозы, пентозы и метилпентозы. С помощью хроматографического метода анализа сахаров установлено, что в состав гексоз входят глюкоза, галактоза, манноза, в состав пентоз — ксилоза и арабиноза. Из метилпентоз в гидролизатах найдены в незначительных количествах рамноза и фруктоза.

В табл. 8 приведены состав и содержание (в %) моносахаридов в гидролизатах, полученных из различного вида сырья.

Таблица 8

Вид сырья (древесина)	Глюкоза	Галактоза	Манноза	Ксилоза	Арабиноза
Ель	70,0	1,7	18,5	8,4	1,4
Береза	54,0	2,2	3,6	38,7	1,5

Содержание РВ и отдельных углеводов (в %) в гидролизатах зависит от вида используемого сырья и способа их получения (табл. 9).

Таблица 9

Сахар	Содержание сахаров в гидролизате, полученном на заводе		
	Ленинградском	Бобруйском	Волгоградском
Общие редуцирующие вещества	3,10	3,00	3,20
Галактоза	0,10	0,12	0,15
Глюкоза	0,9—1,2	1,0	0,6
Манноза	0,6	0,5	1,3
Арабиноза	0,05—0,1	0,1	0,15
Ксилоза	0,5—0,6	0,8—0,9	0,6

Состав щелоков. Сульфитный щелок представляет собой раствор, содержащий продукты гидролиза, окисления и распада легкогидролизуемых гемицеллюлоз древесины, сульфонированный лигнин, а также различные соединения серы.

Сульфитный щелок, отбираемый после варки целлюлозы, имеет различную концентрацию сухих веществ. Например, при одноступенчатых кислых варках целлюлозы нормального выхода содержание сухих веществ в сульфитном щелоке составляет 9—13%. С повышением выхода целлюлозы эта величина соответственно снижается.

Сульфитный щелок содержит большой набор микроэлементов, которые переходят из сырья при варке целлюлозы, а также в результате частичного выщелачивания металла, из которого изготовлено оборудование варочного цеха. Концентрация микроэлементов, присутствующих в щелоке, ничтожно мала (от 10^{-3} до 10^{-6} г/л), но они имеют существенное значение для последующего выращивания на этой среде микроорганизмов.

В состав сульфитного щелока входят лигносульфоновые кислоты, моносахариды, органические кислоты (в основном альдоновые и уксусная), небольшое количество олигосахаридов, состоящих из трех — семи остатков моносахаридов.

Ниже приведен состав щелока, полученного от варки целлюлозы нормального выхода из еловой древесины (в г на 100 мл):

Сухой остаток	9—13
Зольность сухого остатка, %	10—20
Содержание общих РВ	2,7—3,2
Сбраживаемые углеводы, % от общего содержания РВ	62—68
Фурфурол	0,02—0,03
Метилглиоксаль	0,03—0,04
Летучие органические кислоты (в расчете на уксусную)	0,3—0,4
Альдоновые кислоты	0,6—0,8
Метиловый спирт	0,05—0,07

Углеводный состав щелоков зависит от вида и качества сырья, поэтому, по данным различных авторов, наблюдается большой разброс в абсолютных величинах.

Так, количественный состав моносахаридов елового сульфитного щелока составляет (в % от суммы): маннозы 41—52; глюкозы 2—30; галактозы 4—21; фруктозы 0—4; ксилозы 15—28; арабинозы 0—8.

Сульфитные щелоки хвойной древесины по сравнению с лиственной содержат пониженное количество пентоз и соответственно фурфурола. При выходе целлюлозы 50% количество фурфурола составляет 3—4% от РВ. Предельно допустимые нормы содержания вредных при-

месей в гидролизатах и сульфитных щелоках, подготовленных к выращиванию дрожжей, следующие (в %, не более):

Фурфурол и сернистый ангидрид	0,03—0,04
Оксиметилфурфурол (в гидролизатах)	1,0
Лигниновые вещества	0,15—0,20
Сернистый ангидрид	0,03—0,04

Большинство видов дрожжей можно в той или иной степени адаптировать к среде, имеющей в своем составе вредные примеси. Наиболее сильное воздействие на жизнедеятельность дрожжей оказывают вещества лигногуминового комплекса, находящиеся в гидролизате в коллоидном состоянии. Они сорбируются на поверхности дрожжевой клетки, затрудняя обмен веществ дрожжей, а в процессе интенсивной аэрации среды вместе с биомассой дрожжей увлекаются из среды в осадок. Дрожжи частично сорбируют на своей поверхности и другие вещества из питательной среды.

В практике эксплуатации дрожжевых цехов можно наблюдать отрицательное влияние на рост дрожжей механических включений в составе сусла. Кристаллы гипса, окалина и другие примеси во время циркуляции механически воздействуют на оболочку дрожжевой клетки, разрывая ее, что приводит к снижению накапливания биомассы дрожжей.

Микроорганизмы — продуценты белка

В заводской практике и лабораторных исследованиях различные штаммы видов дрожжей Candida utilis, Candida arborea, Candida tropicalis, Candida guilliermondii, Candida scottii и др. нашли широкое применение как продуценты кормового белка при выращивании их на гидролизных субстратах.

Отличительным признаком дрожжеподобных грибов рода Candida является их способность к усвоению пентоз. Поэтому началом гидролизно-дрожжевого производства явилось выращивание дрожжеподобного гриба Candida utilis (Monilia murmanica), выделенного в 1935 г. Плевако, на гидролизатах растительного сырья, содержащих одни пентозы. В дальнейшем большой вклад в се-

лекцию дрожжей, усваивающих пентозы, внесли Крючкова, Имшенецкий, Семушина и др.

Крючкова показала, что дрожжи, размножающиеся в гидролизной и сульфитной послеспиртовой барде, различаются по скорости размножения, выходу биомассы и устойчивости к примесям, подавляющим их развитие в этих средах . По ее данным, выход биомассы (в % от суммы редуцирующих веществ) при культивировании разных дрожжей колеблется от 16 до 58% (табл. 10).

Таблица 10

Расы дрожжей	Использовано, %		Выход абсолютно сухих дрожжей, % от РВ	Содержание белка в дрожжах, %
	РВ	органических кислот		
Candida tropicalis Л-2	72,2	28,0	47,9	41,4
Candida tropicalis СД-5	69,0	43,0	38,7	47,8
Candida sp. Кр-9	82,0	42,2	56,1	45,0
Candida sp. СД-10	80,0	54,3	57,9	54,3
Candida utilis № 451 (Torulopsis utilis)	65,0	57,2	39,5	48,3
Candida guilliermondii К-1	79,6	100	28,3	54,7
Candida arborea К-3	82,5	13,2	40,0	57,4
Hansenula	86,4	22,5	31,4	25,1
Trichosporon Т-3	73,9	40,8	51,6	47,0
Zygofabospora	77,6	35,2	16,7	50,4

Крючковой получены и внедрены в промышленность наиболее урожайные дрожжи рода Candida: Candida species Кр-9 и Candida species СД-10, впоследствии отнесенные к виду Candida scottii. Способность утилизировать ксилозу и арабинозу отличает их от Candida utilis и Candida tropicalis, утилизирующих только ксилозу. Путем адаптации получен арабинозный вариант дрожжей Candida tropicalis СД-5, хорошо усваивающий арабинозу, а также дрожжи, переносящие повышенное содержание фурфурола в среде (до 0,08—0,1%), и дрожжи, способные нормально развиваться в кислой среде при pH 3,8—4,0.

В настоящее время на большинстве гидролизных заводов внедрены наиболее продуктивные штаммы кормовых дрожжей видов Candida scottii (Кр-9, СД-10, Аст-1,

Гуль-1) и Candida tropicalis (Л-2, Кд-14, Ахм-1, Кп-1, Гб-1).

Однако в условиях крупномасштабного нестерильного производства, как правило, развиваются не монокультуры, внедренные первоначально, а ассоциации культур, принадлежащие к 5—8 различным видам. Основной культуре обычно сопутствуют менее урожайные, но более устойчивые к неблагоприятным факторам, такие, как Zygofabospora marxiana, Cryptococcus neoformans и др. На ряде заводов указанные примеси почти полностью вытесняют основную культуру.

Состав дрожжей на заводах, перерабатывающих сульфитно-спиртовую барду, значительно менее разнообразен. Наиболее устойчивой производственной культурой являются дрожжи C. utilis. Они почти на всех заводах являются основной культурой и составляют 80—100% дрожжевой биомассы.

Дрожжи C. utilis обладают способностью синтезировать все витамины и не нуждаются в биофакторах, быстро растут (время генерации 2—3 ч). Близкие к ним дрожжи C. arborea встречаются на сульфитно-спиртовых и гидролизных заводах в качестве примеси к основной культуре.

На сульфитных и гидролизных заводах широко используются также дрожжи видов Candida tropicalis и Candida utilis. C. utilis в условиях выращивания на производственных субстратах оказываются самыми устойчивыми и неприхотливыми, а C. tropicalis — более урожайными, но в отличие от C. utilis они не являются прототрофами, так как не способны синтезировать все витамины. Совместное выращивание обеих этих культур обеспечивает высокий выход биомассы при относительно невысоком требовании к субстрату.

Основные пути усвоения углеводов микроорганизмами

При выращивании микроорганизмов — продуцентов белка — на гидролизатах и сульфитных щелоках основным источником углерода и энергии являются углеводы. Углеводный обмен у микроорганизмов идет двумя основными путями. Первый путь представляет собой совокупность анаэробных ферментативных процессов рас-

пада глюкозы (гликолиз, спиртовое брожение). Второй путь является окислительным распадом глюкозы (процесс дыхания). Центральным звеном этого пути является образование пентоз, вновь превращающихся через ряд промежуточных продуктов в гексозы. Этот путь называют пентозофосфатным, гексозомонофосфатным или апотомическим.

По первому пути в процессе гликолиза высвобождается незначительная часть энергии (188 кДж), которая потенциально может быть извлечена из молекулы глюкозы. При полном окислении глюкозы по второму пути до CO_2 и H_2O высвобождается значительно большее количество энергии (2744 кДж).

Продукты гликолиза, или брожения, — молочная кислота и этиловый спирт — соединения почти такие же сложные, как глюкоза, с ними выводится значительная часть энергии, которая в анаэробных условиях не может быть использована клеткой. Продукт дыхания (CO_2) — значительно более простое соединение, единственный атом углерода которого полностью окислен. Общая схема процесса дыхания приведена на рис. 52.

В условиях аэробного культивирования микроорганизмов ассимиляция углеводов происходит в основном по пентозофосфатному циклу (рис. 53).

Цикл начинается с окисления глюкозо-6-фосфата до 4-фосфоглюконолактона под действием дегидрогеназы. На втором этапе при участии лактоназы происходит гидролитическое расщепление лактона, сопровождающееся раскрытием пиранозного цикла. Помимо 6-фосфоглюконовой кислоты в результате окисления глюкозо-6-фосфата образуется восстановленная форма НАДФ. Третий этап реакции — окисление фосфоглюконовой кислоты при участии дегидрогеназы, коферментом которой также является НАДФ. При этом происходит одновременное декарбоксилирование шестиуглеродного соединения с образованием в зависимости от условий рибулозо-5-фосфата или рибозо-5-фосфата. Таким образом, непосредственным продуктом декарбоксилирования фосфоглюконовой кислоты является пентоза в кетоформе.

В результате реакций изомеризации рибулозо-5-фосфат под действием изомеразы пентозофосфата превращается в рибозо-5-фосфат, а под действием эпимеразы — в ксилулозо-5-фосфат. Образующиеся в результате изомеризации продукты взаимодействуют между собой с образованием седогептулозо-7-фосфата и фосфоглицеринового альдегида. Эта реакция катализируется транскетолазой. Получаемые продукты реакции тотчас вступают во вторую реакцию, в результате которой под действием трансальдолазы образуются фруктозо-6-фосфат и эритрозо-4-фосфат. В результате транскетолазной реакции между эритрозо-4-фосфатом и ксилулозо-5-фосфатом образуются

фруктозо-6-фосфат и фосфоглицериновый альдегид. Далее фруктозо-6-фосфат при участии фермента глюкозофосфатизомеразы превращается в глюкозо-6-фосфат. Изомераза фосфотриоз обеспечивает превращение фосфоглицеринового альдегида в диоксиацетон-3-фосфат. При наличии альдолазы происходит конденсация двух фосфотриоз с образованием фруктозо-1,6-дифосфата, который в дальнейшем переходит во фруктозо-6-фосфат.

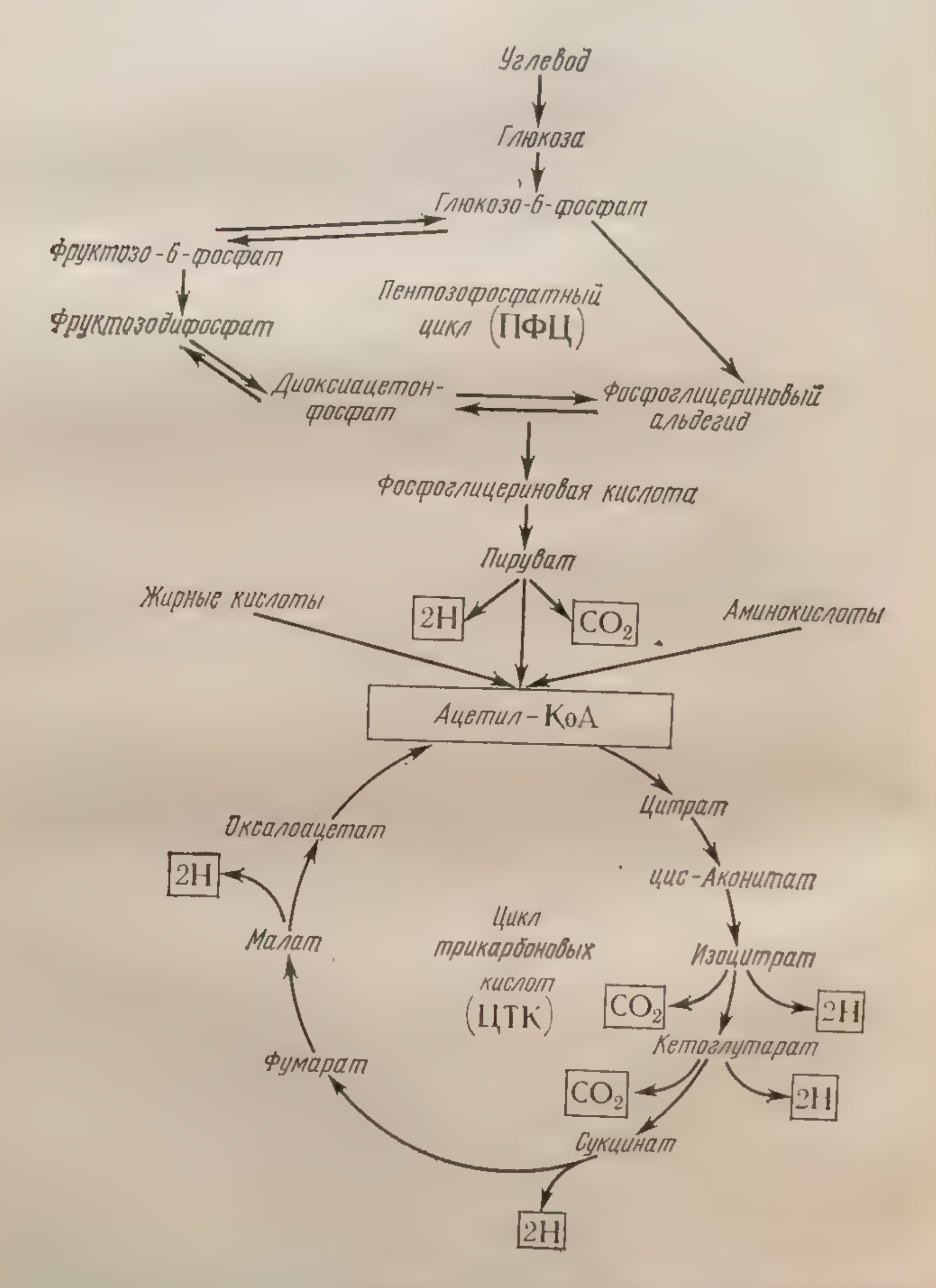


Рис. 52. Схема процесса дыхания дрожжей (в рамках даны конечные продукты каждой стадии).

Основное назначение цикла заключается в генерации в цитоплазме восстановителя в форме НАДФ·Н. Для большинства микроорганизмов пентозофосфатный цикл обеспечивает возможность синтеза рибозо-5-фосфата,

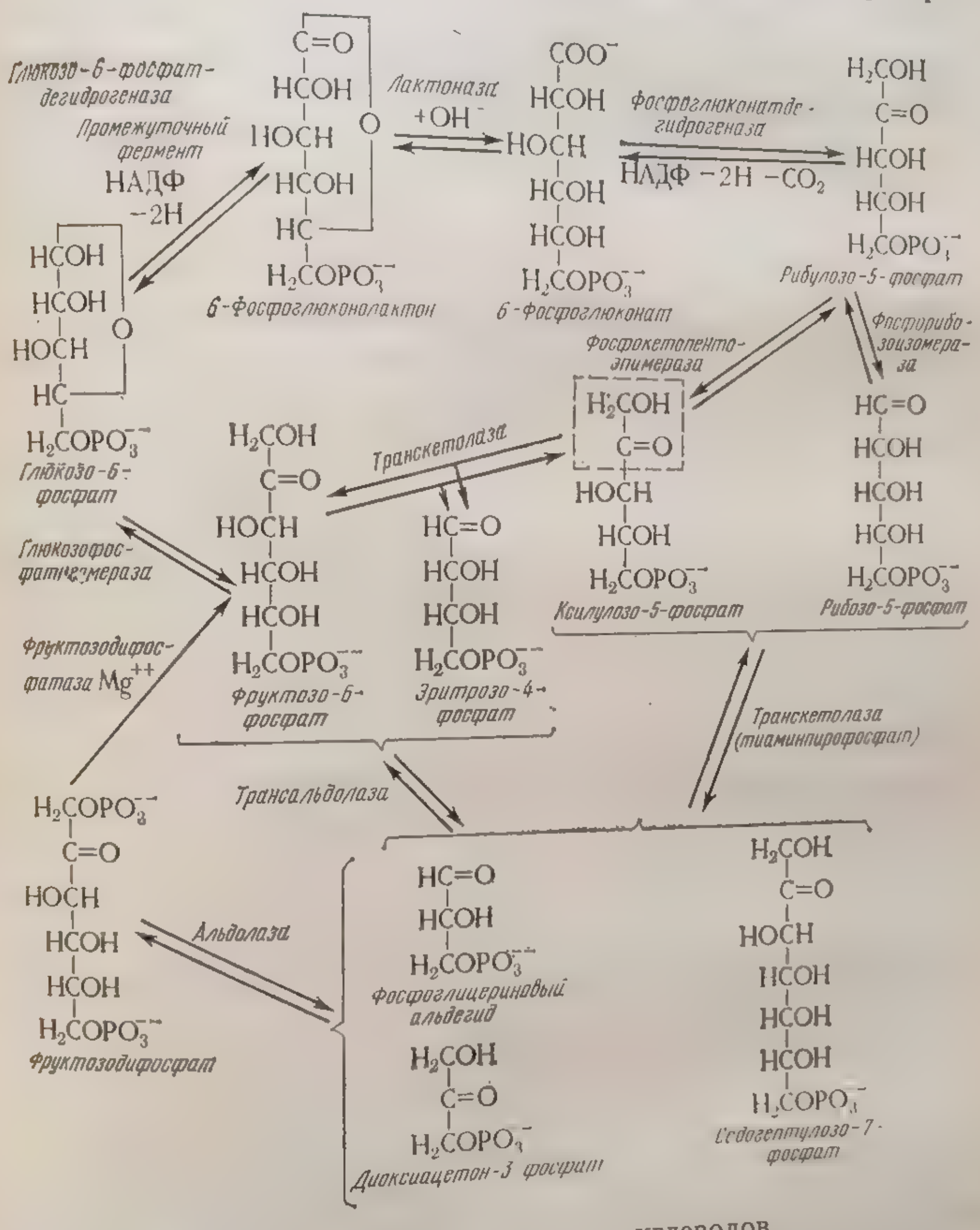


Рис. 53. Пентозофосфатный цикл усвоения углеводов.

участвующего в образовании нуклеотидов и коферментов.

Ферменты пентозофосфатного (фосфоглюконатного) цикла вместе с ферментами гликолитического пути дают возможность взаимопревращений 3-, 4-, 5-, 6- и 7-угле-

родных моносахаридов путем обратимого переноса двух- или трехуглеродных фрагментов.

Начиная с момента окисления фосфотриоз в фосфоглицериновые кислоты, в процессе диссимиляции углеводов наблюдаются те же стадии, что и при гликолитическом цикле обмена.

Молекулы ацетил-КоА, образовавшиеся не только из углеводов, но и из жиров и аминокислот, вступают в цикл трикарбоновых кислот (см. рис. 52), который называется также циклом Кребса — конечный путь окислительного катаболизма в аэробных условиях. В этом цикле ацетильные группы расщепляются с высвобождением CO_2 и атомов водорода. Суммарная реакция цикла трикарбоновых кислот описывается уравнением $CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 8H$. Главная функция гликолитического цикла заключается в дегидрировании уксусной кислоты, приводящем к образованию двух молекул CO_2 и четырех пар атомов водорода.

Рис. 54. Схема процесса переноса электронов по дыхательной цепи.

При каждом обороте цикла молекула уксусной кислоты взаимодействует с молекулой четырехуглеродного соединения — щавелево-уксусной кислоты, образуя лимонную кислоту — соединение, содержащее 6 углеродных атомов. Лимонная кислота при разрушении дает две молекулы CO_2 и четырехуглеродное соединение — янтарную кислоту, которая в процессе постепенного окисления превращается в щавелево-уксусную, способную вновь включаться в цикл. Таким образом, в каждом обороте в цикл вовлекается молекула уксусной кислоты и образуются 2 молекулы CO_2. Одна молекула щавелево-уксусной кислоты, расходуемая на образование лимонной кислоты, в конце цикла регенерируется, и поэтому практически одной этой молекулы достаточно для окисления неограниченного числа молекул уксусной кислоты.

Атомы водорода, выделяемые в цикле трикарбоновых кислот (четыре пары), включаются в дыхательную цепь, состоящую из серии переносчиков электронов (рис. 54). Процесс переноса электронов по дыхательной цепи к конечному акцептору электронов — молекулярному кислороду — сопровождается значительным уменьшением свободной энергии, которая запасается в форме АТФ, образующегося в результате сопряженного с окислением фосфорилирования АДФ.

Технологические схемы получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на гидролизатах и сульфитных щелоках

Технологические схемы производства белковых препаратов включают следующие основные операции: приготовление посевного материала, приготовление питательной среды, выращивание микроорганизмов, выделение дрожжей флотацией, концентрирование суспензии микроорганизмов на сепараторах, плазмолиз, сушку и фасовку.

Для получения наибольших выходов белковых препаратов и более полной утилизации моносахаридов используют различные способы соединения ферментаторов в процессе выращивания микроорганизмов: последовательный и параллельно-последовательный. На рис. 55 представлена технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на гидролизатах растительных отходов с двучленной последовательно соединенной батареей дрожжерастильных аппаратов.

По этой схеме подготовленный нейтрализованный гидролизат после дополнительного охлаждения на пластинчатых теплообменниках (от 35—38 до 28—30° С) подается в первый дрожжерастильный аппарат батареи. Сюда же задаются питательные соли в виде аммофоса, аммиачная вода для поддержания pH, вода или отработанная бражка для разбавления, посевной материал и воздух из воздуходувки. Дрожжевая суспензия непрерывно поступает во второй аппарат, где происходит доутилизация моносахаридов. Выращенные дрожжи из второго дрожжерастильного аппарата поступают на двухступенчатый

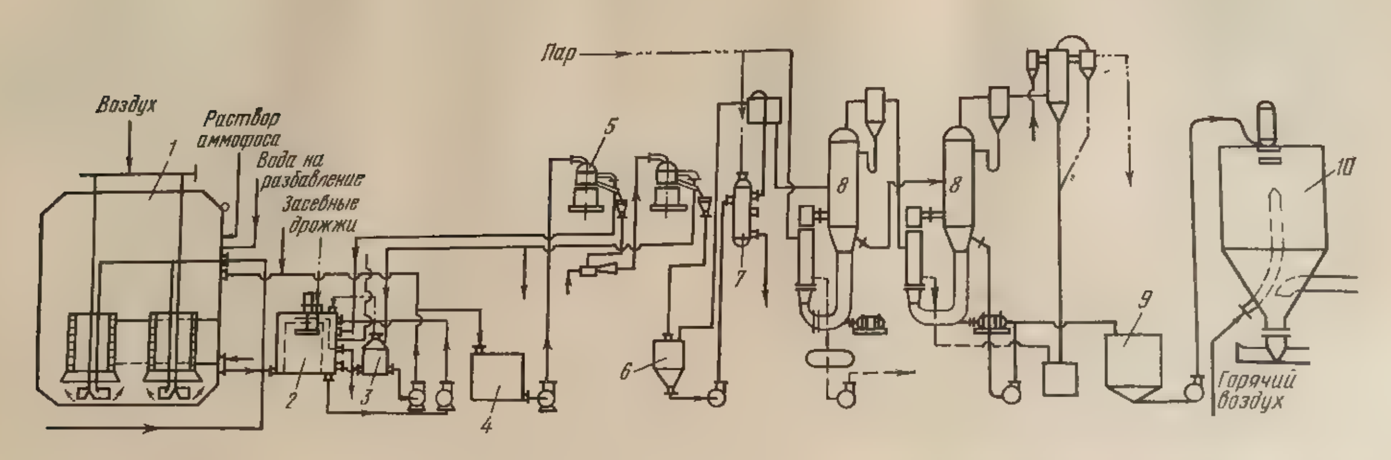


Рис. 55. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на гидролизатах древесины и сульфитных щелоках:

1 — дрожжерастильный аппарат; *2* — флотатор; *3* — газоотделитель; *4* — сборник дрожжевой суспензии; *5* — сепаратор; *6* — сборник дрожжевого концентрата; *7* — плазмолизатор; *8* — выпарной аппарат; *9* — сборник упаренного дрожжевого концентрата; *10* — распылительная сушилка.

флотатор. Частично сконцентрированная дрожжевая суспензия из флотатора второй ступени через газоотделитель направляется в сборник, а отделенная дрожжевая бражка подается на разбавление сусла, на приготовление питательных солей и другие операции. Из сборника дрожжевая суспензия направляется на сепараторы I ступени. Для уменьшения потерь дрожжей отделенная на этой ступени жидкость возвращается на II ступень флотаторов. Дрожжевая суспензия из сепараторов I ступени с помощью водоструйного насоса подается на промывку и сгущение на сепараторы II ступени. Отработанная промывная вода из сепараторов II ступени возвращается в газоотделитель, где происходит смешивание ее с дрожжевой суспензией, подаваемой на сепараторы I ступени. Из сепараторов II ступени сгущенная дрожжевая суспензия направляется в сборник, из которого затем перекачивается в плазмолизатор. После плазмолиза дрожжевая суспензия проходит стадии концентрирования на вакуум-выпарной установке и сушки в распылительной или вальцовой сушилке. Сухие дрожжи пневмотранспортом подаются в промежуточный бункер и на упаковку.

Такая замкнутая схема, предусматривающая использование отработанной дрожжевой бражки на разбавление питательной среды, позволяет значительно сократить потери сахаров, однако увеличивает опасность заражения производственной культуры посторонними микроорганизмами, что может привести к разложению микроорганизмов, торможению процесса накопления биомассы.

Двухступенчатая схема выращивания дрожжей на сусле с высокой концентрацией сухих веществ характеризуется тем, что на I ступени дрожжи выращиваются на неразбавленном сусле с концентрацией сухих веществ 3,0—3,5% с повышенным недобродом — 1,0—1,2%. На этой ступени ассимилируются наиболее легко усвояемые сахара — гексозы. Дрожжи после I ступени выращивания полностью отделяются от культуральной жидкости, а отработанная бражка с содержанием сухих веществ 1—1,2%, содержащая в основном пентозы, поступает на II ступень, где для более полной утилизации могут использоваться другие культуры дрожжей, усваивающие в основном пентозы.

Схемы двухступенчатого выращивания микроорганизмов внедрены на многих заводах. При этом на I ступени выращивают дрожжи, а на последрожжевой бражке — микроскопические грибы.

Особенности процесса выращивания микроорганизмов на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках

Потребление субстрата и выход биомассы

При выращивании дрожжеподобных грибов на гидролизных средах основным источником углерода, необходимым для жизнедеятельности данных микроорганизмов, являются моносахариды и органические кислоты.

Как уже указывалось, в состав гидролизатов и сульфитных щелоков входят различные 5- и 6-углеродные сахара: глюкоза, манноза, галактоза, ксилоза и арабиноза. Отличительной особенностью дрожжеподобных грибов рода Candida, используемых в гидролизной промышленности для получения кормового белка, является их способность усваивать пентозы. Первоначально субстратом для их выращивания служила только послеспиртовая гидролизная барда, в состав которой входят ксилоза, галактоза и арабиноза. Опыт работы показал, что различные виды дрожжей Candida не в одинаковой степени утилизируют отдельные моносахариды, в частности пентозы. Поэтому необходимо было подобрать такие расы дрожжей и режимы культивирования, которые обеспечили бы максимальное потребление всех сахаров в питательных средах (гидролизате, сульфитном щелоке, послеспиртовой барде).

Исследования по утилизации смеси сахаров, проведенные с производственными штаммами дрожжей C. utilis, C. tropicalis и C. arborea, наиболее часто культивируемыми на сульфитно-щелочных средах, показали, что у всех видов аспорогенных дрожжей наблюдается одна и та же очередность потребления моносахаридов: в первую очередь они используют глюкозу, затем ксилозу и галактозу. Причем галактоза утилизировалась полностью лишь дрожжами C. tropicalis. Медленнее других усваивалась арабиноза. Дрожжи C. utilis и C. arborea слабо усваивали галактозу и совсем не усваивали арабинозу.

Аналогичные исследования, проведенные при выращивании дрожжей C. utilis, штамм Тал-1, непосредственно на сульфитном щелоке, показали, что очередность в утилизации сахаров сохраняется (глюкоза→манноза→ксилоза→галактоза→арабиноза).

При выращивании дрожжей на средах с одними пентозами (по схемам 2 и 4), например на сульфитно-спиртовой барде, наблюдается более активное потребление их дрожжами по сравнению с утилизацией из смеси, содержащей сахара с пятью и шестью углеродными атомами (по схемам 3 и 4).

Таблица 11

Потребление сахаров									
ксилозы					арабинозы				
при длительности культивирования, ч									
0	4	6	8	10	0	4	6	8	10
C. tropicalis Сл-1									
0,50	0,15	0	0	—	0,30	0,30	0,10	0,10	—
0,50	0,10	0	0	—	0,30	0,25	0,10	0,10	—
C. utilis П-1									
0,50	0,45	0,30	Следы	0	0,30	0,30	0,15	0,10	0,10
0,50	0,50	0,25	0,10	0	0,30	0,30	0,30	0,15	0,10

В табл. 11 приведены данные по динамике потребления сахаров (в %) при выращивании дрожжей C. tropicalis Сл-1 и C. utilis П-1 на сульфитно-спиртовой барде. Из таблицы видно, что дрожжи C. tropicalis Сл-1 потребляют сахара с бóльшей скоростью, чем C. utilis П-1.

В табл. 12 представлены данные по приросту биомассы этих же дрожжей при выращивании их на сульфитно-спиртовой барде. Результаты показывают, что дрожжи C. tropicalis Сл-1 используют 75—77% РВ барды и дают выход биомассы (по отношению к РВ) 66—67%. Дрожжи C. utilis П-1 усваивают несколько меньшее количество РВ (67—69%), а выход абсолютно сухой биомассы составляет всего 45—47%.

При использовании смешанных культур микроорганизмов, например штаммов C. tropicalis Сл-1 и C. utilis П-1, наблюдается почти полное потребление сахаров из среды, при этом скорость их утилизации значительно выше, чем при использовании чистых культур.

Таблица 12

Количество потребленных РВ, %	Содержание в дрожжах белка, %	Выход абсолютно сухих дрожжей, % от РВ	Прирост биомассы абсолютно сухих дрожжей, г/л
	C. tropicalis Сл-1		
76,7	52,5	66,5	7,4
75,1	51,9	67,2	7,5
	C. utilis П-1		
66,9	46,8	46,7	5,0
68,8	47,0	44,6	4,8

Сопутствующие чистым культурам малоурожайные дикие формы микроорганизмов медленно потребляют углеводы среды и дают небольшой прирост биомассы.

Так, например, гриб Zygofabospora marxiana Br. 3 достаточно быстро потребляет гексозы и очень медленно — пентозы, начиная с 4—5 ч роста. Гриб Trichosporon cutaneum усваивает быстро и активно только глюкозу, другие же сахара утилизирует медленно и после определенного времени адаптации: маннозу — через 2 ч, галактозу — через 3 ч, а ксилозу — через 5—6 ч, т. е. значительно медленнее, чем культурные дрожжи, используемые в производстве. Эти микроорганизмы появляются в заметных количествах в дрожжерастильных чанах при замедлении производственного процесса, при увеличении времени пребывания дрожжей в аппарате и т. д.

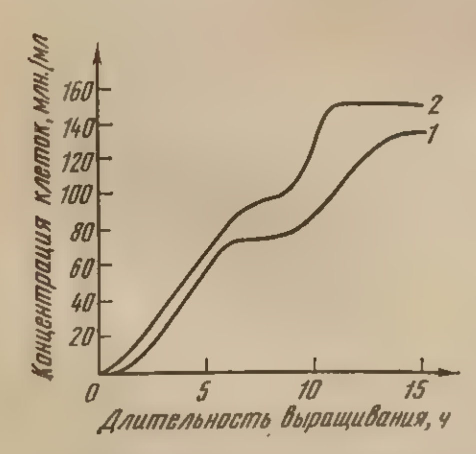


Рис. 56. Характер размножения дрожжей Candida tropicalis Кп-1 на смеси гидролизата с послеспиртовой бардой (*1*) и гидролизате, разбавленном водой (*2*), при одинаковой концентрации РВ (1,60%).

На ряде предприятий используют в качестве питательной среды не только разбавленный второй гидролизат, но и смесь гидролизата с послеспиртовой бардой. Эти среды заметно различаются по содержанию (в %) моносахаридов (табл. 13).

Таблица 13

Моносахариды	Гидролизат + вода (1:1)	Гидролизат + послеспиртовая барда (1:1)
Галактоза	0,07—0,05	0,09—0,08
Глюкоза	0,60—0,50	0,60—0,56
Манноза	0,30—0,20	0,35—0,30
Сумма гексоз	0,97—0,75	1,04—0,93
Арабиноза	0,05—0,04	0,11—0,10
Ксилоза	0,30—0,28	0,56—0,53
Сумма пентоз	0,35—0,32	0,67—0,63

При использовании для выращивания дрожжей смеси послеспиртовой барды с гидролизатом в соотношении 1 : 1 прирост дрожжевых клеток значительно замедляется (рис. 56). Поэтому смесь гидролизата с бардой является возможным, но менее эффективным субстратом для выращивания дрожжей, чем гидролизат, разбавленный водой, и послеспиртовая барда, перерабатываемые порознь. Причина этого может заключаться как в глюкозном эффекте, так и в возможно большей примеси ингибирующих веществ в смеси.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на гидролизатах и сульфитных щелоках

Состав питательной среды. Среды, приготовляемые на основе непищевого сырья и используемые для выращивания микроорганизмов, содержат кроме углеводов нелетучие и летучие органические кислоты. В сульфитных щелоках это — уксусная, муравьиная, альдоновые и уроновые кислоты. В послеспиртовой барде органические кислоты представлены молочной, пировиноградной, фумаровой, янтарной, пропионовой и другими кислотами, образующимися в процессе спиртового брожения. При сульфитной варке целлюлозы с кислотой, содержащей в своем составе щелок от горячего «облагораживания» целлюлозы, получают сульфитные щелоки с новыми свойствами, количество органических кислот в которых резко увеличивается.

Наиболее продуктивные производственные штаммы кормовых дрожжей, растущих на сульфитных щелоках и сульфитно-спиртовой барде, активно потребляют уксусную и молочную кислоты. При выращивании дрожжей на разбавленных растворах уксусной и муравьиной кислот муравьиная кислота из смеси усваивается дрожжами так же хорошо, как и уксусная.

С возрастанием длины углеродной цепи жирных кислот от C_1 до C_7 увеличивается время их усвоения дрожжами; для окисления кислот с более длинной углеродной цепью необходимо большее количество кислорода.

Для дрожжей рода Candida 0,2—0,3%-ная масляная кислота является хорошим источником углерода и энергии. Некоторые дрожжи способны усваивать в качестве единственного источника углерода капроновую кислоту.

Различная степень поглощения органических кислот клетками микроорганизмов зависит от проницаемости клеточных оболочек, от степени диссоциации кислот и, следовательно, от величины pH среды. Максимальная скорость ассимиляции уксусной кислоты наблюдается при pH 5,6; при pH ниже 5,0 уксусная кислота оказывает токсическое действие на рост дрожжей.

При добавлении в среду с ксилозой уксусной кислоты наблюдается увеличение выхода дрожжей по сравнению с выращиванием на одной ксилозе. Но повышение доли уксусной кислоты в среде приводит к увеличению времени выращивания, так как момент начала потребления ксилозы наступает не сразу и на ее полное потребление требуется больше времени. Микроорганизмы, выращиваемые на еловых сульфитных щелоках, используют углеводы и уксусную кислоту в следующей последовательности: глюкоза→галактоза→уксусная кислота→манноза→ →ксилоза.

Дрожжевой клетке, как и всякому живому организму, требуется для развития определенное минеральное питание. Питательными минеральными веществами являются соединения азота, фосфора, калия, магния, серы, железа и других элементов, находящиеся в водном растворе.

При получении кормовых дрожжей, когда требуется интенсивное их размножение, необходимо добавлять в среду значительное количество соединений азота, фосфо-

ра, магния, калия. Не все известные соединения, включающие эти элементы, усваиваются дрожжами.

Так, большинство дрожжей хорошо растут на средах, содержащих сернокислый и фосфорнокислый аммоний и водный раствор аммиака. Соединения азота в виде соли азотной кислоты не всегда усваиваются дрожжами. Только некоторые виды дрожжей способны усваивать нитраты и почти не усваивают нитриты. По-разному относятся дрожжи к соединениям фосфора: хорошо потребляются однозамещенные фосфорнокислый аммоний и фосфорнокислый кальций, фосфорная кислота; плохо — фосфорнокислые соли железа и аммония. Калий усваивается дрожжами в виде хлорида; магний — в виде хлорида и сульфата.

В гидролизатах и сульфитных щелоках имеются в небольшом количестве необходимые для дрожжей микроэлементы, перешедшие в раствор из растительных тканей, основных и вспомогательных материалов и внесенные с водой. Недостающие соединения вносят дополнительно из расчета на 50% выхода дрожжей от суммы сахаров (РВ) в среде. Обычно соли фосфора и калия вносят в виде раствора аммофоса, который содержит (в %): P_2O_5 — 1,3, минерального азота — 0,4, хлористого калия — 1,2. Ориентировочный состав сред (в %) на основе гидролизатов представлен в табл. 14.

Таблица 14

Компоненты питательной среды	Исходные субстраты		Среда для выращивания дрожжей	
	гидролизат (pH 2,5)	барда (pH 4,2)	гидролизат, разбавленный водой в соотношении 1:1 (pH 4,6—4,8)	смесь гидролизата с бардой 1:1
Галактоза	0,15	0,05	0,07	0,07
Глюкоза	1,20	—	0,60	0,60
Манноза	0,70	—	0,30	0,30
Арабиноза	0,10	0,10	0,05	0,10
Ксилоза	0,55	0,55	0,30	0,55
Летучие кислоты	0,13	0,25	0,06	0,20
P_2O_5, мг/л	28,0	85	400	450
Азот минеральный, мг/л	10,0	15	940	880
Фурфурол	0,02	—	0,01	0,01
Общее содержание РВ	3,1	0,65	1,7	1,6

При переработке отходов сельскохозяйственных культур (кукурузной кочерыжки, подсолнечной лузги и хлопковой шелухи) потребность в некоторых микроэлементах может отпасть, так как в самих растительных материалах часто содержится большое количество солей. Каждый раз потребность в солевой добавке должна определяться экспериментально.

В качестве биостимуляторов в производственных условиях могут быть использованы различные вещества: дрожжевой автолизат, меласса, протертые листья хлопчатника, вытяжка солодовых ростков и др.

Разные штаммы дрожжей неодинаково реагируют на наличие в среде биостимуляторов. В табл. 15 приведены

Таблица 15

Культура	С автолизатом (+) и без него (—)	Использовано РВ, %	Выход абсолютно сухих дрожжей, %
C. utilis Тал-1	+	100	46,0
	—	100	44,0
C. utilis Инг-1	+	96	42,3
	—	100	43,0
C. tropicalis Сл-1	+	100	60,4
	—	58	27,0
C. tropicalis Ск-5	+	100	52,1
	—	65	27,6

данные о влиянии добавки (1%) дрожжевого автолизата как источника витаминов на урожайность дрожжей при выращивании их на синтетической среде с глюкозой.

Как видно из таблицы, добавление дрожжевого автолизата к среде практически не сказывается на развитии C. utilis Тал-1 и Инг-1, а у C. tropicalis Сл-1 и Ск-5 при этих условиях выход биомассы увеличивается в 2 раза.

Установлено, что дрожжи C. tropicalis нуждаются в биотине. Чтобы компенсировать потребность данных микроорганизмов в биотине, предложено использовать смесь дрожжевых культур разных видов. При этом дрожжи-прототрофы обеспечивают потребность в биотине дрожжей C. tropicalis.

Перспективным стимулятором роста кормовых дрожжей является дестиобиотин, полученный синтетическим путем в Институте органической химии АН СССР.

Применение нефтяного ростового вещества (НРВ) при выращивании кормовых дрожжей на гидролизатах и сульфитных щелоках дает увеличение выхода биомассы на 4—5%. При этом затрачивается 5 мг НРВ на 1 л гидролизной среды.

Применение в качестве биостимулятора кукурузного экстракта в количестве 0,01—0,1% также повышает выход дрожжей на 3—4%.

Условия культивирования. К факторам, влияющим на жизнедеятельность микроорганизмов, относятся температура среды и ее активная кислотность. В зависимости от используемого продуцента оптимальная температура питательной среды для выращивания кормовых дрожжей может быть в пределах 32—40° С. При температурах среды ниже 32° С наблюдается замедление процесса обмена веществ и снижение активной жизнедеятельности дрожжевой клетки. С увеличением температуры повышается скорость синтеза белков, но это происходит до определенных пределов, так как наряду с процессами синтеза идут процессы распада, скорости которых также увеличиваются.

Наибольшая активность дыхания у большинства исследуемых дрожжей наблюдается при температуре 38—40° С. При температуре среды выше 40° С активность поглощения кислорода резко падает, снижается выход биомассы, а содержание белка в дрожжах уменьшается с 48—49 до 36—37%. При температуре среды выше допустимой наблюдается агглютинация — группирование дрожжевых клеток в комочки, что говорит о начавшемся распаде, омертвлении дрожжевых клеток.

Если используемые продуценты способны нормально развиваться при высоких температурах, целесообразно процесс выращивания дрожжей вести при максимально возможной температуре. В этом случае уменьшается возможность развития посторонней микрофлоры, для охлаждения можно применять воду с повышенной температурой. Оптимальной температурой для выращивания C. utilis является 30—35° С, для C. tropicalis — 36—37, для C. scottii — 38—39 и даже 40° С.

Активная кислотность среды оказывает существенное влияние на биосинтетическую способность дрожжевой клетки. Для нормального развития и размножения дрожжей необходимо поддерживать концен-

трацию водородных ионов в питательной среде на строго определенном оптимальном уровне. Для кормовых дрожжей наиболее приемлемым и благоприятным для роста и размножения является pH 5,0—5,5. Допустимые же пределы лежат в интервале pH от 3,5 до 5,7, практически 4,2—4,6.

В процессе размножения дрожжей на послеспиртовой барде, как правило, кислотность среды падает вследствие того, что содержащиеся в ней некоторые органические кислоты утилизируются дрожжами.

При размножении дрожжей на гидролизате или сульфитном щелоке происходит обратный процесс, т. е. повышение кислотности среды. Это происходит потому, что во время интенсивного размножения дрожжи усваивают азот аммонийных солей, а в среде накапливаются анионы серной кислоты, в результате чего pH среды понижается.

В этом случае хороший эффект для стабилизации pH среды дает использование вместо $(NH_4)_2SO_4$ аммиака в виде аммиачной воды.

Кормовые дрожжи, полученные при культивировании микроорганизмов на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках, характеризуются следующим составом (в %): белок — 43 — 58; липиды 0,3—4,0; углеводы 11—23; зола — 11. Влажность дрожжей 6—10%.

В кормовом белке, полученном при выращивании дрожжей на гидролизатах и сульфитных щелоках, присутствует большой набор аминокислот (в г на 100 г белка):

Триптофан	1,5/1,3
Лизин	6,8/6,1
Метионин	1,7/0,9
Аргинин	5,6/4,1
Гистидин	2,4/1,5
Треонин	4,2/5,2
Валин	5,1/5,6
Изолейцин	5,0/5,8
Лейцин	7,6/8,6
Фенилаланин	4,2/4,4
Цистин	1,3/0,9

Примечание. В числителе приведены усредненные данные по содержанию аминокислоты в белке при культивировании микроорганизмов на гидролизатах, в знаменателе — на сульфитных щелоках.

Глава 3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА — НА ДРУГИХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕВОДНОГО СЫРЬЯ

В последнее время помимо традиционных источников сырья для производства кормовых дрожжей — кислотных гидролизатов растительного сырья и сульфитных щелоков — большое внимание уделяется другим источникам органического сырья, например торфам. Торф, особенно верховой, малой степени разложения, содержит в своем составе до 50% полисахаридов и до 15—17% уроновых кислот. При соответствующих условиях кислотного гидролиза торф может стать источником легкоусваиваемых микроорганизмами моносахаридов.

Большой интерес представляют разработки по щелочной обработке древесины, позволяющие повысить выход белковых препаратов за счет утилизации микроорганизмами продуктов щелочной деструкции лигнина.

Селекция микроорганизмов, обладающих способностью развиваться на негидролизованных полисахаридных средах, значительно расширит возможные источники сырья и позволит использовать отходы животноводческих ферм и городские стоки, предварительная химическая обработка которых неэкономична вследствие низкого содержания в них полисахаридов.

Перспективными источниками сырья для производства белковых препаратов могут стать отходы пищевой промышленности, такие, как послеспиртовая барда и молочная сыворотка.

§ 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГИДРОЛИЗАТАХ ТОРФА

Для производства кормовых дрожжей в качестве сырья можно использовать верховой малоразложившийся торф. Пригодными для гидролитической переработки признаны торфы моховой группы со степенью разложения до 20%. Эта группа торфов представлена следующими видами: медиум-, фускум-торфом, сфагновым мочажинным и комплексным верховым.

Характеристика торфа как сырья для выращивания микроорганизмов

Органическая часть торфов имеет сложный химический состав и включает в себя такие компоненты, как битумы, водорастворимые, легкогидролизуемые полисахариды (гемицеллюлозы) и гуминовые вещества (фульво- и гуминовые кислоты), трудногидролизуемые полисахариды, представленные в основном целлюлозой, и негидролизуемый остаток. Содержание этих компонентов у торфов различно и зависит от ботанического состава и степени разложения торфа. Химический элементарный состав некоторых исходных торфообразователей, углеводный состав фракций легко- и трудногидролизуемых полисахаридов приведены в табл. 16 и 17.

Таблица 16

Компоненты торфа	Содержание компонентов во мхе, %	
	сфагновом (степень разложения-0)	зеленом (степень разложения—до 5 %)
Битум бензольный	1,7	4,0
Легкогидролизуемые вещества	63,4	44,7
в том числе РВ	31,5	33,3
Трудногидролизуемые вещества	27,0	22,2
в том числе РВ	25,2	22,0
Суммарное содержание гидролизуемых веществ	90,4	66,9
в том числе РВ	56,7	55,3
Гуминовые вещества	5,6	26,5
В том числе:		
гуминовые кислоты	3,8	17,0
фульвокислоты	1,8	9,5
Негидролизуемый остаток	2,2	2,7
Элементарный состав:		
C	45,8	48,7
H	5,3	5,7
N	0,81	0,88
S+O	40,8	36,8

При характеристике торфа как сырья для микробиологической промышленности наибольшее значение имеет установление природы веществ, переходящих в раствор при гидролизе разбавленной соляной кислотой (табл. 18).

Таблица 17

Моносахарид	Содержание моносахаридов, %			
	легкогидролизуемых		трудногидролизуемых	
	от РВ	от органического вещества	от РВ	от органического вещества
Галактоза	27,7	8,7	—	—
Глюкоза	19,4	6,1	77,8	19,6
Манноза	11,1	3,5	7,0	1,8
Арабиноза	3,9	1,2	—	—
Ксилоза	16,6	5,2	4,3	1,1
Итого	91,6	28,9	89,1	22,5

Таблица 18

Компоненты торфа	Содержание (в % от абсолютно сухого вещества) в торфе				
	медиум		фускум		сфагновом мочажинном
	со степенью разложения, %				
	4—5	15—18	5—8	20—23	5—10
Зольные вещества	2,06	1,61	2,35	2,14	2,00
Вещества, экстрагируемые смесью спирт — бензол	4,53	7,00	3,05	8,23	3,10
Вещества, переходящие в раствор при гемицеллюлозном гидролизе	61,2	48,9	58,9	41,7	59,6
Легкогидролизуемые полисахариды (по РВ)	25,9	26,3	28,0	18,5	32,1
Трудногидролизуемые полисахариды (по РВ)	16,6	14,5	17,4	12,2	19,0
Полисахариды (общее содержание)	42,5	40,8	45,4	30,7	51,1
Целлюлоза (по глюкозе)	13,95	—	14,36	10,72	—
Негидролизуемый остаток	16,3	25,6	15,3	37,7	13,9
Азот (общий)	0,73	1,09	0,76	1,23	0,89
Ацетильные группы	0,50	0,39	0,40	0,40	0,47
Метоксильные группы	0,92	1,23	0,86	1,34	0,81
Уроновые кислоты	16,1	11,3	17,4	10,4	13,0
Потенциальный фурфурол	11,8	11,3	11,8	7,8	11,8

Согласно данным табл. 18 при гидролизе легкогидролизуемых полисахаридов 2%-ной соляной кислотой растворяется 41,7—61,2% органических веществ торфа. При этом количество моносахаридов составляет только 41,6—46,7% от веществ, перешедших в раствор. Следует отметить, что 18,9—24,1% от суммы органических веществ гидролизата составляют уроновые кислоты, присоединенные в молекуле ксилана к основной линейной цепи α-связью в положении 1→2. При мягком гидролизе эта связь рвется и от 76,0 до 81,6% уроновых кислот, содержащихся в торфе, переходит в раствор. Легко декарбоксилируясь, уроновая кислота превращается в пентозу:

$$\underset{\text{Уроновая кислота}}{COOH-(CHOH)_4-C\begin{matrix}\nearrow O \\ \searrow H\end{matrix}} \longrightarrow \underset{\text{Пентоза}}{CH_2OH-(CHOH)_3-C\begin{matrix}\nearrow O \\ \searrow H\end{matrix}} + CO_2$$

В торфе имеются и другие группы органических соединений, при мягком гидролизе которых образуются редуцирующие вещества, например экстрагируемые смесью спирт — бензол битумы, при гидролизе которых образуется до 40—60% РВ, половину из которых составляют углеводы.

В состав гуминовых веществ входят легкогидролизуемые полисахариды, количество которых составляет 9,9—14,6%. За счет гуминовых кислот, содержание которых в верховых торфах малой степени разложения составляет 10—20%, при гидролизе образуется от 1 до 3% РВ в пересчете на абсолютно сухой торф.

Азотсодержащие вещества торфа, представленные различными классами соединений (нитратами, солями аммония, амидосоединениями, белковыми веществами и т. д.), находятся во всех группах органических соединений. В частности, в пушинцевом торфе с общим содержанием азота 1,5% азот распределяется по группам соединений следующим образом (в % от общего количества): битумы 5,6; лигнин и целлюлоза (целлолигнин) 13,3; гуминовые вещества 81,1. В число гуминовых веществ входят как гуминовые кислоты и их соли, так и возможные комплексы кислот с протеинами.

Азотсодержащие вещества гуминовых кислот с основным комплексом органических соединений торфа связа-

ны с различной степенью прочности. Большая часть этих соединений (64—75%) представляет собой очень легко гидролизуемые продукты распада белков или аминокислоты, непрочно связанные с гуминовыми веществами.

Торф как сырье для выращивания микроорганизмов обладает преимуществами перед другими видами сырья, так как он содержит азот и фосфор в легкоусваиваемой микроорганизмом форме, поэтому расходы на введение в состав среды питательных солей (сернокислого аммония и суперфосфата) значительно сокращаются и себестоимость получаемых дрожжей снижается.

Способы и особенности гидролиза торфа

Перколяционный способ гидролиза, нашедший широкое распространение в гидролизной промышленности, непригоден для торфа. Основная причина этого заключается в том, что торф оказывает значительное сопротивление проходящей через него жидкости, что не позволяет создать необходимую скорость перколяции. Низкое содержание целлюлозы в торфе не дает заметного повышения РВ с увеличением продолжительности варки, а замедленная скорость фильтрации приводит к разложению образовавшихся моносахаридов. Диффузия сахаров при гидролизе внутри частичек торфа протекает очень медленно, вследствие чего варочный раствор не насыщается сахарами и не вымывает их из гидролизуемой массы.

Для гидролиза торфа могут быть использованы следующие способы.

Стационарный способ гидролиза. Осуществляется разбавленными кислотами при повышенном давлении и высокой температуре с отделением гидролизата от лигнина вне гидролиз-аппарата. Гидролиз проводится при следующем режиме: гидромодуль[1] 10, концентрация кислоты 0,3%, давление 0,7—0,9 МПа, время гидролиза (варки) 20—30 мин. По окончании варки все содержимое гидролиз-аппарата выдувается в сцежу, где гидролизат отделяется от лигнина, затем лигнин отжимается на прессах. Свободностекающий и отжимной гидролизаты нейтрализуют и подвергают биохимической перера-

[1] Гидромодуль — отношение массы экстрагирующей жидкости к массе обрабатываемого материала.

ботке. Выход РВ 24,3% от абсолютно сухого вещества торфа, концентрация РВ в гидролизате 2,0—2,4%.

Непрерывный гидролиз торфа по методу П. Ф. Сопина. Осуществляется 0,5%-ной серной кислотой при 160° С, начальный гидромодуль 4,3—4,5. Прогревание торфа и смешивание его с кислотой должны быть равномерными. Торф подогревается паром, образующимся при охлаждении гидролизованного торфа, и подается в аппарат для гидролиза, где он нагревается до температуры реакции. Затем вводится в аппарат разбавленная кислота и осуществляется гидролиз торфа. При охлаждении прогидролизованного торфа образуется пар самоиспарения, который и используется на первой стадии процесса. Выход РВ по этому методу составляет 23,5%.

Химический состав гидролизатов торфа, полученных при гидролизе 0,5%-ной серной кислотой, следующий (в % от СВ): редуцирующие вещества 1,26—1,95 (в том числе после инверсии 1,26—2,01); азот общий 0,016—0,038, минеральный 0,0007—0,0088, органический 0,015—0,029; зола 0,097—0,191; P_2O_5 — 0,0023—0,0061; фурфурол — 0,017—0,043.

При гидролизе торфа негидролизуемый остаток, в состав которого входят неуглеводные компоненты (гуминовые и фульвокислоты, битумы, воски и лигнин), составляет 35—50% от массы перерабатываемого торфа.

Гидролиз торфа малым количеством концентрированной серной кислоты. По этому способу можно получить выход РВ до 36,7%.

Гидролиз торфа проводится в шнековом гидролиз-аппарате, в котором смесь торфа с кислотой подвергается интенсивному сжатию и истиранию, сопровождающимися повышением температуры до 70—110° С. В таких условиях значительная часть полисахаридов торфа гидролизуется. Торфяная гидролизованная масса, содержащая продукты гидролиза и реверсии, смешивается с водой в соотношении 1 : 3÷4. Легкоподвижная пульпа подвергается инверсии при 120° С и поступает на барабанный вакуум-фильтр.

Комбинированный метод гидролиза торфа концентрированной серной кислотой. Верховой торф со степенью разложения 10% первоначально гидролизуют 0,5%-ной серной кислотой при гидромодуле 10 и давлении 0,6 МПа в течение 30 мин. Гидролизат гемицеллюлоз отделяют,

торфяной целлолигнин высушивают, измельчают и смешивают с 80%-ной серной кислотой при гидромодуле 0,2. Затем проводят дополнительный гидролиз при температуре 60—65° С, гидролизат инвертируют 10%-ной серной кислотой в течение 3 ч при 100° С. При лабораторных испытаниях выход РВ по этому методу практически равен теоретически возможному.

Влияние на процесс гидролиза гидромодуля кислоты в диапазоне от 1 : 1 до 1 : 0,1 соответственно результирующей концентрации кислоты и соотношения твердой и жидкой фаз представлено в табл. 19.

Таблица 19

Гидромодуль кислоты	Результирующая концентрация, %	Соотношение твердой и жидкой фаз, кг/кг	Водорастворимые РВ, % от массы торфа		Легкогидролизуемые РВ, % от массы торфа	Трудногидролизуемые РВ, % от массы торфа
			без инверсии	после инверсии		
0,1	21,4	1:0,47	16,4	25,3	8,3	14,2
0,15	28,0	1:0,53	16,1	15,0	8,1	13,9
0,2	33,3	1:0,60	15,8	24,6	8,0	13,7
0,3	40,9	1:0,73	15,6	24,6	7,6	13,0
0,6	52,9	1:1,13	15,8	25,3	7,1	12,3
1,0	60,0	1:1,67	15,8	27,4	3,8	7,8

Как видно из таблицы, при гидролизе торфа гидромодуль кислоты на образование водорастворимых РВ практически не влияет.

Химический состав гидролизатов торфа малой степени разложения, полученных при гидролизе концентрированной серной кислотой, следующий (в %):

Органические вещества	6,0—9,4
Зола	0,03—0,96
РВ общие	3,6—5,54
Моносахариды	1,7—3,9
в том числе в % к органическим веществам	28,0—45,4
Бромируемые вещества	0,18—0,42
Коллоидные вещества	2,2—3,4
Азот (в % к азоту торфа)	23,6—52,1
Аминокислоты	0,01—0,03
в том числе в % к органическим веществам	0,14—0,36
Летучие органические вещества	0,07—0,11

Продолжение

в том числе в % к органическим веществам	1,0—1,3
Нелетучие органические кислоты	0,33—1,35
в том числе в % к органическим веществам	4,1—16,0
Железо	0,13—0,18

Непрерывный способ гидролиза разбавленной серной кислотой с применением реактора идеального вытеснения. Этот способ разработан во ВНИИгидролиз. Он является перспективным и заслуживает наибольшего внимания.

По этому способу (рис. 57) верховой малоразложившийся торф любой влажности путем смешивания с водой (гидромодуль 8—10) превращается в пульпу. Насосом *2* пульпа подается в смеситель инжекторного типа *3*, где смешивается с концентрированной серной кислотой до создания в растворе 0,5—0,7%-ной кислоты. Затем пульпа проходит подогреватель инжекторного типа *4*, нагреваясь до температуры реакции (160—170° С), и поступает в трубчатый реактор *5* идеального вытеснения. В реакторе пульпа находится в течение времени, необходимого для получения максимального выхода РВ. После этого через регулятор выдачи *6* пульпа поступает в испаритель, где отделяются пары самоиспарения и температура снижается до 100—102° С. Далее пульпа идет на отделение осадка.

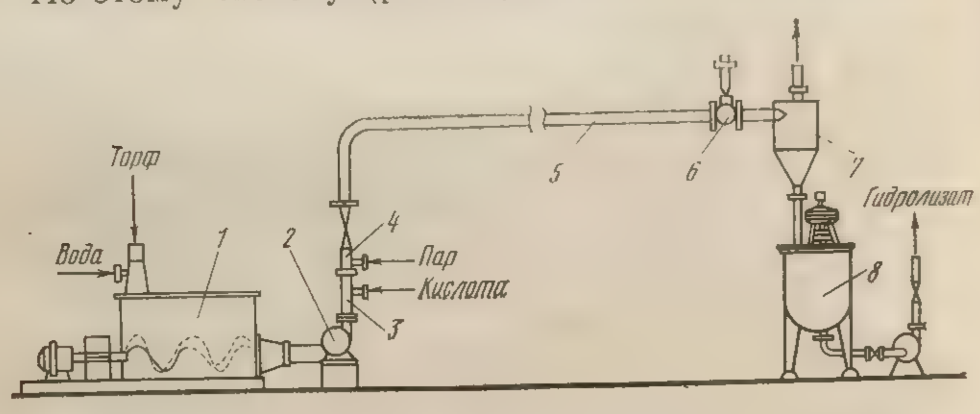
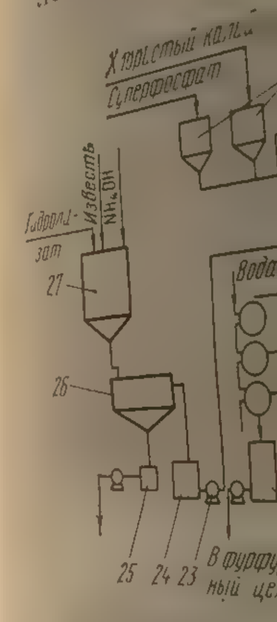


Рис. 57. Схема непрерывного гидролиза торфа с применением реактора идеального вытеснения:

1 — смеситель; *2* — насос; *3* — смеситель (для ввода в пульпу кислоты); *4* — подогреватель; *5* — реактор; *6* — регулятор выдачи гидролизата; *7* — испаритель; *8* — сборник гидролизата.



Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на гидролизатах торфа

На рис. 58 представлена технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на гидролизатах торфа. Из цеха гидролиза торфа гидролизат подается в отстойники *27*. Раствор после отстаивания поступает в сборник *26*, а шлам — в сбор-

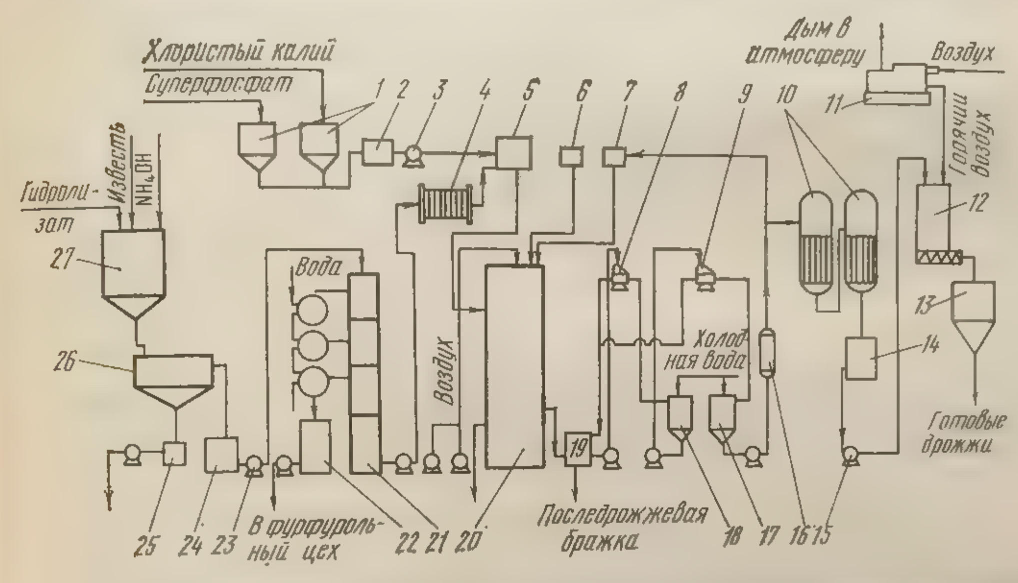


Рис. 58. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на торфяных гидролизатах:

1 — аппараты для приготовления питательных солей; *2* — сборник раствора питательных солей; *3, 15, 23* — насосы; *4* — пластинчатый теплообменник; *5* — смеситель; *6* — бак для аммиачной воды; *7, 16* — плазмолизаторы; *8, 9* — сепараторы соответственно первой и второй промывки дрожжей; *10* — корпуса выпарной установки; *11* — топочная установка; *12* — распылительная сушилка; *13* — бункер готовых дрожжей; *14* — сборник концентрированных дрожжей; *17* — сборник промытых дрожжей; *18* — сборник дрожжей, оборудованный мешалкой; *19* — двухступенчатый флотатор; *20* — дрожжерастильный аппарат; *21* — трехступенчатый вакуум-аппарат (охладитель); *22* — сборник конденсата, содержащего фурфурол; *24* — сборник очищенного конденсата; *25* — сборник шлама; *26* — отстойник нейтрализата; *27* — нейтрализатор.

ник с мешалкой *24*, из которого насосами *25* он периодически откачивается на обезвоживание. Из сборника *26* насосом *23* гидролизат непрерывно подается в трехступенчатый вакуум-аппарат, где его температура снижается с 60—65 до 25—30° С. При охлаждении гидролизата с парами самоиспарения частично отгоняется фурфурол. Из вакуум-аппарата гидролизат через пластинчатый теплообменник и смесительный аппарат непрерывно подает-

ся в головные дрожжерастильные аппараты *20*. В смесительный аппарат одновременно подаются вода для разбавления гидролизата до содержания РВ 1,6—1,8% и раствор, содержащий фосфор и калий. В дрожжерастильные аппараты поступают также посевной материал (в пусковой момент или в процессе культивирования), автолизат дрожжей из аппарата *7* и в случае необходимости — аммиачная вода. Из головных аппаратов *20* дрожжевая суспензия самотеком поступает в хвостовой аппарат, где завершается процесс выращивания дрожжей. Отсюда дрожжевая суспензия самотеком поступает в двухступенчатый флотатор *19*, из которого последрожжевая бражка перекачивается в систему очистных сооружений, а дрожжевая суспензия, разбавленная водой от второй промывки и чистой холодной водой, насосом подается в сепараторы *8* первой промывки. Промывная вода подается на II ступень флотатора, а дрожжевая суспензия, содержащая в 1 л около 400 г влажных прессованных дрожжей, направляется в сборник с мешалкой *18*. Здесь дрожжи разбавляются чистой холодной водой, после чего перекачиваются в сепараторы *9* второй промывки. Из последних вода поступает в центральный сосуд флотатора, а дрожжевая суспензия, содержащая в 1 л около 600 г прессованных дрожжей, — в сборник *17*. Промытые дрожжи непрерывно подаются через плазмолизатор *16* на выпарную установку *10*, где они упариваются под вакуумом в двух последовательно соединенных корпусах до содержания абсолютно сухих дрожжей около 25%. Из второго корпуса дрожжи поступают в сборник *14*, а затем насосом *15* непрерывно подаются через распределительный диск в корпус сушилки *12*. Сюда же поступает и воздух, нагретый до 280—300° С в топочном агрегате *11*, в котором сжигается фрезерный торф. Осевшие в сушильном корпусе и циклоне дрожжи ячейковым выгружателем подаются в бункер *13*. Сухие дрожжи фасуют в бумажные мешки и направляют потребителям.

При культивировании дрожжей Candida tropicalis выход дрожжей составляет 50,0—65,5% от РВ, содержание белка — 38—47,2%. Кормовые дрожжи, выращенные на торфяных субстратах, превосходят (особенно по содержанию аминокислот) дрожжи, полученные на древесном сырье: содержание белка в них достигает 46—50%, ли-

пидов — 5,2—5,6, золы 5,8—7,9%. Содержание аминокислот (в г на 100 г белка) следующее:

Лизин	7,5	Изолейцин	7,5
Метионин	0,7	Лейцин	7,9
Аргинин	9,8	Фенилаланин	4,2
Гистидин	2,8	Аспарагиновая кислота	10,0
Треонин	5,5	Глютаминовая кислота	14,0
Валин	5,7		

§ 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ПРОДУКТАХ ЩЕЛОЧНОГО РАСЩЕПЛЕНИЯ ДРЕВЕСИНЫ

Метод промышленного получения белковых препаратов при выращивании микроорганизмов на гидролизатах древесины имеет некоторые недостатки: часть образующихся моносахаридов в процессе гидролиза сырья подвергается распаду с образованием продуктов, не усваиваемых микроорганизмами; лигнин превращается в инертный полимер; для аппаратурного оформления процесса гидролиза требуется большое количество дорогостоящих и дефицитных кислотоупорных материалов. Все это привело к поиску новых, более эффективных методов расщепления древесины с получением субстратов, пригодных для выращивания кормовых дрожжей.

Одним из возможных путей решения этой задачи может быть щелочное расщепление содержащихся в древесине полисахаридов при повышенных температурах. Для этой реакции характерно последовательное отщепление концевых редуцирующих звеньев с образованием определенных типов сахариновых кислот и других продуктов распада. При высоких температурах возможно и прямое, гидролитическое расщепление гликозидных связей. Лигнин в условиях щелочной обработки почти полностью переходит в раствор, распадаясь частично до мономеров. Опыты по щелочному расщеплению осиновой древесины, проводимые у нас в стране в последнее десятилетие Шарковым и Слюняевым, показали возможность практически полной ее деструкции с образованием сложной смеси продуктов, состоящей из органических кислот, карбонильных соединений, фенолов, нейтральных веществ и углекислоты.

При одноступенчатом процессе, используя щелочь концентрацией 4%, при гидромодуле 10, температуре 200° С возможно увеличение количества расщепленной древе-

сины с 69,2 до 85,4% при некотором увеличении времени обработки. При двухступенчатом способе обработки количество расщепленной древесины увеличивается до 95%, количество усваиваемых продуктов (кислот и карбонильных соединений) составляет 61,7%.

Двухступенчатый способ обработки характеризуется следующими параметрами:

	I ступень	II ступень
Концентрация щелочи, %	1,0	4,0
Гидромодуль	10	10
Температура, °С	200	200
Продолжительность обработки, ч	5	6

Лигнин осиновой древесины растворялся значительно легче, чем лигнин других пород древесины. Процесс деструкции древесины березы, сосны и ели при щелочной двухступенчатой обработке этих пород характеризуется данными, приведенными в табл. 20.

Таблица 20

Показатели	Содержание продуктов (в %) при двухступенчатой щелочной обработке древесины		
	березы	сосны	ели
Растворено древесины	95,8	98,1	94,2
Коллоиды	8,4	23,4	23,0
Органические кислоты	67,1	62,5	64,3
Карбонильные соединения	9,9	7,1	5,4
Нейтральные вещества	2,0	2,5	2,1
Фенолы	2,3	2,4	1,8

Таким образом, с помощью щелочного расщепления можно перерабатывать все основные древесные породы, однако наибольшего растворения можно достичь при работе с сосновой древесиной.

Щелоки, полученные двухступенчатой щелочной обработкой древесины, после очистки электродиализом и фильтрования использовались для биохимической переработки. Особенность переработки продуктов щелочного расщепления древесины связана с содержанием в них большого количества кислот[1], утилизируемых дрожжами в качестве основного источника углерода:

[1] Считается, что оптимальная концентрация кислот в растворе для выращивания кормовых дрожжей должна быть 0,3—0,4%.

Кислоты	Содержание в щелоке, %
Летучие	9,0
В том числе:	
муравьиная	5,8
уксусная	3,2
Смоляные и жирные	2,6
Оксикислоты	28,4
В том числе:	
гликолевая, молочная, оксимасляная	12,6
неидентифицированная	6,8
глицериновая	1,2
диоксимасляная	4,3
неидентифицированная	0,7
яблочная	2,4
винная	0,67
Углекислота	6,3

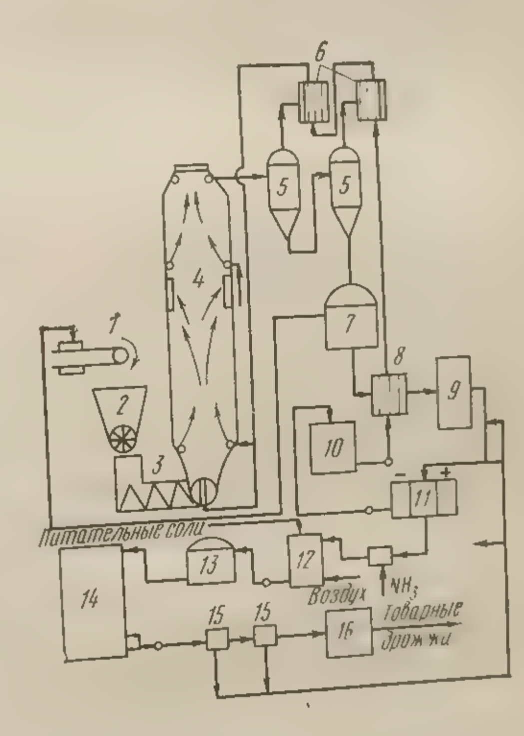


Рис. 59. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на продуктах щелочного расщепления древесины:

1 — транспортер; *2* — бункер; *3* — ротационный питатель; *4* — варочный аппарат непрерывного действия; *5* — испарители; *6* — теплообменники испарителей; *7* — фильтр; *8* — теплообменник; *9* — вакуум-охладительная установка; *10* — сборник; *11* — установка электродиализа; *12* — сборник нейтрализованного гидролизата; *13* — фильтр; *14* — дрожжерастильный аппарат; *15* — сепаратор; *16* — сушилка.

Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на продуктах щелочного расщепления древесины представлена на рис. 59. Так как древесина растворяется в щелочи практически полностью, в основу данной технологической схемы положен непрерывный способ щелочной деструкции древесины. Основным элементом данной схемы является варочный аппарат непрерывного действия *4*. В этот аппарат поступает как свежее сырье (щепа, опил-

ки), так и часть древесины, оставшаяся нерастворенной после гидролиза.

Количество необходимых питательных веществ рассчитывается на 1 кг усваиваемых веществ и составляет (в кг): K_2HPO_4 — 0,04; $MgSO_4$ — 0,03; KCl — 0,075. При выращивании дрожжей Candida tropicalis Сясь-1 на продуктах щелочного расщепления древесины количество посевного материала составляет 50% от массы кислот и карбонильных соединений (влажность дрожжей 75%). Выход биомассы в этом случае значительно выше, чем при кислотном гидролизе. Полученные дрожжи имеют белый цвет, в них содержится 49,7—51,1% белка.

В табл. 21 приведены данные по выращиванию дрожжей Candida tropicalis Сясь-1 на продуктах щелочного расщепления древесины различных пород.

Таблица 21

Порода древесины	Выход дрожжей (в %) по отношению		Содержание в бражке, %	
	к кислотам и карбонильным соединениям	к древесине	кислот	карбонильных соединений
Береза	50,4	36,9	0,05	—
Сосна	47,6	31,5	0,06	0,03
Ель	47,0	31,0	0,05	—

§ 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА НЕГИДРОЛИЗОВАННОМ ПОЛИСАХАРИДНОМ СЫРЬЕ

В последние годы наряду с развитием производства белковых препаратов на гидролизатах растительных отходов рассматриваются способы выращивания микроорганизмов непосредственно на целлюлозосодержащем сырье. Использование отходов лесного и сельского хозяйства (древесных опилок, стружек, выжимок, сахарной свеклы и тростника, соломы и шелухи, хлопчатника и подсолнечника, стеблей и початков кукурузы и т. д.) без предварительного дорогостоящего кислотного гидролиза позволит значительно сократить себестоимость производства белковых препаратов.

Некоторые микроорганизмы способны усваивать полисахариды и активно накапливать биомассу. Наличие таких микроорганизмов значительно расширяет источники



целлюлозосодержащего сырья для производства кормовых биомасс микроорганизмов, включая, например, сточные воды бумажных производств, животные экскременты, промывные воды картофелеперерабатывающих заводов, городские сточные воды и др., гидролиз которых экономически нецелесообразен.

Характеристика сырья и способы его подготовки

Растительные отходы. Для лучшего усваивания микроорганизмами целлюлозосодержащего растительного сырья рекомендуется предварительная мягкая обработ-

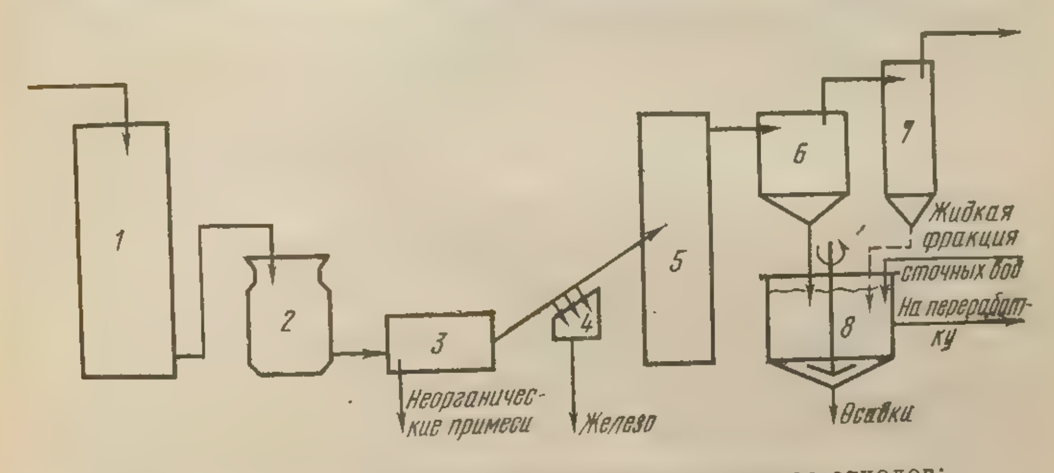


Рис. 60. Схема предварительной обработки городских отходов:

1 — приемный бункер; *2* — грубый измельчитель; *3* — барабанное сито; *4* — магнитный сепаратор; *5* — тонкий измельчитель; *6* — воздушный сепаратор; *7* — циклон для воздуха; *8* — отстойник.

ка его 4%-ным раствором NaOH при температуре 100° С в течение 15 мин. В этих условиях усваиваемость целлюлозы повышается до 70—75%.

Хороший эффект достигается при предварительной обработке сырья под избыточным давлением (0,1 МПа) в присутствии 1 н. раствора NaOH.

Городские отходы. Схема предварительной обработки городских отходов представлена на рис. 60. Она включает двухстадийный процесс измельчения отходов. На первой стадии измельчение осуществляется до номинальных размеров частиц — 10—15 см. Далее отходы пропускаются через барабанное сито, где удаляются тонкие неорганические примеси и стекло. Металлические примеси

удаляются с помощью магнитного сепаратора. На второй стадии отходы измельчаются до размеров частиц 4—6 см. Далее поток сырья проходит через воздушный сепаратор для удаления фракции газовых отходов. Подвижная фракция передается в танк-отстойник, куда сливаются и сырые сточные воды. После такой механической подготовки городские отходы подвергаются предвари-

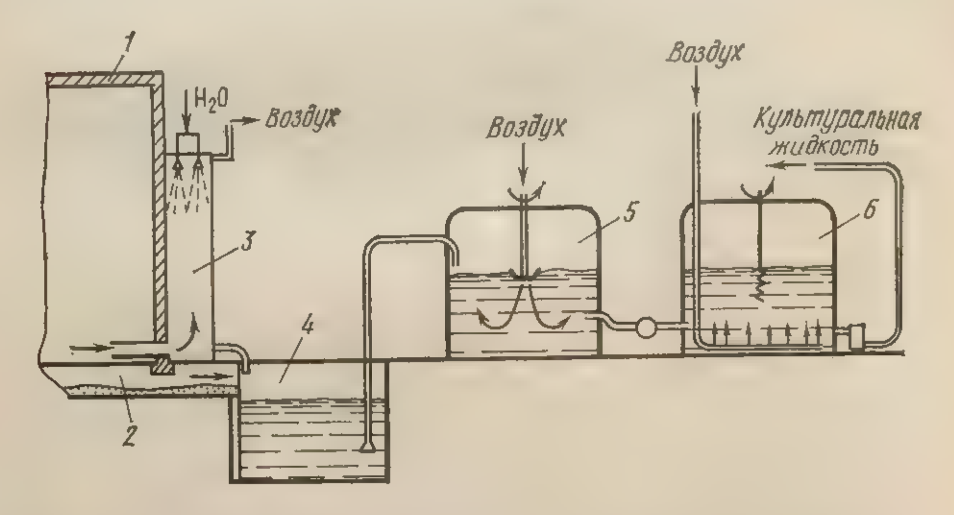


Рис. 61. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на животных экскрементах:

1 — хлев; *2* — смывные каналы; *3* — камера очистки воздуха; *4* — сборник стоков; *5* — аппарат предварительной обработки стоков; *6* — дрожжерастильный аппарат.

тельной биохимической обработке, подобной той, которая рекомендуется для животных экскрементов.

Отходы животноводства, экскременты животных. Животные экскременты, например навоз свиней, крупного рогатого скота, с животноводческих ферм *1* (рис. 61) по множеству смывных каналов собираются в закрытый сборник, расположенный вне помещения, где содержатся животные. Туда же сливаются воды после орошения выделяемого из хлева воздуха. Из сборника *4* промывные воды с экскрементами насосом перекачиваются в аппарат для биохимической обработки *5*. Этот аппарат снабжен механической мешалкой с верхним электрическим приводом. При постоянном перемешивании и притоке свежего воздуха в содержимом сосуда развиваются аэробные бактерии, окисляющие вредные для развития микроорганизмов — продуцентов белка — компоненты

животных экскрементов. Благодаря теплоизоляции аппарата тепло, выделяемое при развитии микроорганизмов, не теряется. Температура в аппарате поднимается до 60—70° С, при которой происходит частичная гибель патогенных микроорганизмов. Подготовленное сырье передается в дрожжерастильные аппараты *6*.

Микроорганизмы — продуценты белка

Микроорганизмы — продуценты белка, усваивающие в качестве источника питания и энергии целлюлозу и гемицеллюлозы, должны обладать активным комплексом целлюлолитических и гемицеллюлазных ферментов. Среди возможных продуцентов белка на целлюлозосодержащем сырье имеются представители как грибов, так и бактерий, особенно бактерии родов Cellulomonas, Alcaligenes. Например, бактерии Cellulomonas cartaluticum, ассимилируя целлюлозу сточных вод бумажных производств, накапливают обильную биомассу. При этом выход биомассы на негидролизованной целлюлозе или целлюлозе, обработанной в мягких условиях щелочью, значительно выше, чем на сахарсодержащих растворах.

Среди дрожжей встречается очень мало видов, способных утилизировать негидролизованные полисахариды, например дрожжи Trichosporon cutaneum и Tr. pullulans, выделенные с листьев и стеблей ревеня.

Для повышения выхода и улучшения качества белковых препаратов рекомендуется совместное культивирование нескольких микроорганизмов. Примером таких смешанных культур может служить симбиотическое выращивание Cellulomonas и Alcaligenes faecalis.

В процессе роста бактерий рода Cellulomonas в культуральной жидкости накапливается значительное количество целлобиозы, которая, по-видимому, ингибирует синтез целлюлазы и препятствует накоплению биомассы. Бактерии Alcaligenes faecalis, ассимилируя целлобиозу, позволяют повысить выход биомассы в 3 раза. Вместо бактерий Alcaligenes faecalis могут быть использованы дрожжи, например Candida guilliermondii, Tr. cutaneum.

Другим примером смешанной культуры является совместное выращивание на полисахаридном сырье дрожжей Candida utilis и Endomycopsis fibuliger. Культура Endomycopsis fibuliger, обладая комплексом гидролити-

ческих ферментов, гидролизует полисахариды до моносахаридов, которые потребляются быстрорастущими дрожжами Candida. Конечная биомасса состоит на 90—95% из дрожжей Candida и на 5—10% — из Endomycopsis.

При использовании смешанных культур одна культура, обладая гидролитическими ферментами, может иметь низкую продуктивность, тогда как другие симбиотические культуры, ассимилируя готовые продукты гидролиза, должны обеспечивать высокий выход биомассы.

Известны опыты по использованию актиномицетов в качестве продуцентов белка на целлюлозе.

Особое место среди возможных продуцентов белка на целлюлозосодержащем сырье занимают микроскопические грибы. Обладая высокой способностью к образованию целлюлаз, гемицеллюлаз и других гидролитических ферментов, они могут развиваться в естественных условиях на самых разнообразных субстратах.

К активным продуцентам белка, растущим на полисахаридах, можно отнести грибы родов Tricholoma, Morchella, Mortierella, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium.

Микроорганизмы Chrisosporium lignorum, Myrothecium verrucaria способны синтезировать белок, усваивая отходы лесоперерабатывающих и бумажных производств. Гриб Sporotrichum pulverulentum способен усваивать лигнин древесины. Это направление утилизации отходов, очень перспективное в будущем, еще только начинает развиваться.

Технологические схемы получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на негидролизованном полисахаридном сырье

Перспективен способ получения кормового белка путем выращивания бактерий Cellulomonas на выжимках свеклы или сахарного тростника (багассы). Для повышения усваиваемости целлюлозы микроорганизмами рекомендуется проводить предварительную обработку сырья щелочью, которая вызывает частичную деполимеризацию и делигнификацию субстрата. Схема производства белка из целлюлозы при культивировании Cellulomonas на багассе приведена на рис. 62.

В настоящее время в опытных условиях разработана технология микробиологической переработки отходов древесины при культивировании гриба Chrisosporium lignorum. При культивировании данного продуцента на 1%-ной суспензии отходов целлюлозы через 5—6 сут разлагается около 65% целлюлозы, выход биомассы со-

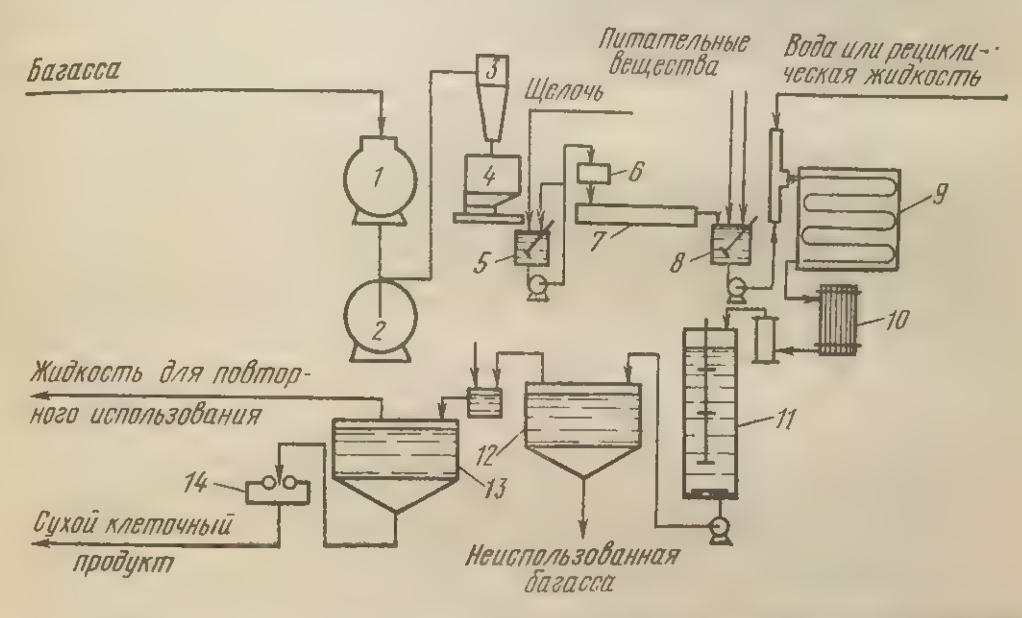


Рис. 62. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании Cellulomonas на багассе:

1 — шаровая мельница; *2* — воздуходувка; *3* — циклон; *4* — весы автоматические; *5* — емкость для обработки щелочью; *6* — сепаратор; *7* — транспортер; *8* — реактор для приготовления питательной среды; *9* — стерилизатор; *10* — теплообменник; *11* — ферментатор; *12*, *13* — смесители-отстойники; *14* — сушилка.

ставляет 60% от массы потребленного субстрата.

Существуют технологические линии по переработке бумажной макулатуры для получения обогащенных белком микробных масс. Для утилизации целлюлозы бумажных отходов используется гриб Myrothecium verrucaria. Он хорошо растет на предварительно обработанной на шаровой мельнице газетной бумаге, активно потребляет целлюлозу и накапливает значительное количество биомассы. Выход белка повышается с увеличением концентрации газетной бумаги в питательной среде. Получаемый конечный продукт — мицелий гриба — легко отделяется фильтрованием и может быть успешно использован на корм скоту.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на целлюлозосодержащем сырье

Состав питательной среды. Различные источники целлюлозосодержащего сырья и других полисахаридов бедны азотом. При выращивании микроорганизмов на таких субстратах необходимо вносить дополнительное азотное питание в виде минерального или органического азота. Так, использование в качестве основного углеродсодержащего сырья отходов картофелеперерабатывающей промышленности для выращивания грибов родов Penicillium, Rhizopus и др. требует внесения в среду аммонийного питания в количестве 0,05—0,15% в виде NH_4NO_3, а также смеси солей $NaNO_3$ и $(NH)_2SO_4$.

Рис. 63. Влияние источников азота на рост Cellulomonas:

1 — бисульфат аммония; *2* — бикарбонат аммония; *3* — хлорид аммония; *4* — нитрат аммония; *5* — сульфит аммония; *6* — сульфат аммония; *7* — мочевина; *8* — хлорид натрия; *9* — ацетат аммония.

Лучшими источниками азота при выращивании бактериальной культуры Cellulomonas на отходах сахарного тростника (багассе) являются бисульфат и бикарбонат аммония. Самое низкое накопление биомассы этой культуры наблюдалось в присутствии ацетата аммония (рис. 63). Оптимальная концентрация азота равна 0,3—0,6 г/л.

Большое влияние на рост микроорганизмов и накопление ими белка оказывает не только определенный уровень азота, но и определенное содержание фосфора в среде: оно должно быть в пределах 0,04—0,08%. Недостаток или избыток фосфора в среде, как правило, снижает выход биомассы. Следует, однако, помнить, что оптимальное соотношение азота и фосфора, обеспечивающее максимальную продуктивность, изменяется в зависимости от вида микроорганизма и требует эксперименталь-

ного уточнения в каждом конкретном случае. Например, для Cellulomonas соотношение N : P, обеспечивающее наилучший выход биомассы, лежит в пределах от 0,8 до 1,6.

Для большинства микроскопических грибов лучшими источниками фосфора являются фосфорнокислые соли калия. Например, внесение 0,4% KH_2PO_4 приводит к увеличению выхода биомассы гриба Penicillium digitatum с 12,4 до 18,0 г/л, а содержание белка в биомассе возрастает с 50,7 до 58,7%.

Помимо источников углерода, азота и минеральных веществ для обеспечения оптимального роста микроорганизмов на целлюлозосодержащем сырье в некоторых случаях необходимо внесение в среду витаминов и ростовых веществ. Хорошими источниками биостимуляторов роста и аминокислот для биосинтеза клеток микроскопических грибов являются кукурузный экстракт и дрожжевой автолизат. Стимулирующее влияние на накопление биомассы микроорганизмов на целлюлозосодержащих средах оказывают витамины (биотин, фолиевая кислота).

При выращивании микроорганизмов на таких средах, как отходы картофелекрахмального производства, содержащих достаточное количество стимулирующих веществ, внесения дополнительных биостимуляторов не требуется.

Условия культивирования. Рост микроскопических грибов на целлюлозосодержащих отходах происходит наиболее интенсивно при температурах 23—32° С. Для бактерий оптимальный интервал температур несколько шире (от 25 до 40° С), но все же чаще всего выращивание проводится при 33—35° С.

Известны способы выращивания на целлюлозосодержащих отходах термофильных микроорганизмов, для роста которых оптимальной является температура 55—60° С.

Оптимальная величина pH для роста микроскопических грибов на полисахаридном сырье находится в пределах 4,0—7,0 и часто соответствует оптимальной величине для синтеза гидролитических ферментов. Например, при выращивании гриба Penicillium digitatum 24П в диапазоне pH от 2,5 до 8,0 максимальное накопление биомассы и синтез белка наблюдаются в пределах 5,0—5,5 (рис. 64). Использование в качестве продуцента белка бактериальных культур сдвигает, как правило, оптимум

рН питательной среды ближе к нейтральной или слабощелочной зоне, обычно в пределах от 6,5 до 8,0.

Состав грибной биомассы, выращенной на целлюлозосодержащем сырье, следующий (в %): белок — 45—55; липиды — 4—8; зола—5—8; клетчатка — 5—15; вода — 6—10. В биомассе содержатся аминокислоты (в г на 100 г белка): лизин — 4—7; метионин — 2,0—2,8; треонин—4,3—5,3; валин—5,0—6,9; изолейцин — 3,1—3,6; лейцин—6,3—8,7; фенилаланин—3,9—5,6; цистин—2,9—3,5; тирозин — 2,8—3,4.

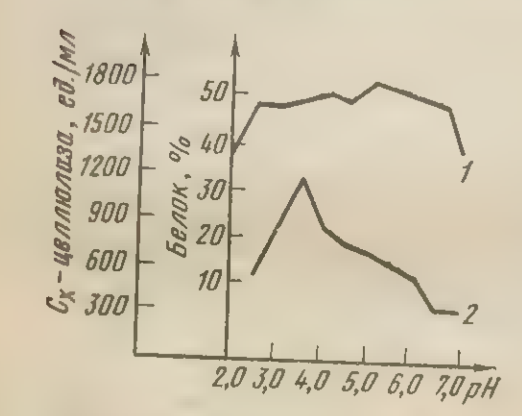


Рис. 64. Влияние рН среды на синтез белка и образование C_x-целлюлазы грибом Penicillium digitatum 24П:

1 — белок; *2* — C_x-целлюлаза.

При выращивании грибной биомассы на целлюлозосодержащем сырье образуется небольшое количество нуклеиновых кислот (1,5—2,0%), в отличие от дрожжей (6—7%) и бактерий (8—15%).

§ 4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЗЕРНО-КАРТОФЕЛЬНОЙ И МЕЛАССНОЙ БАРДЕ

Технологический процесс выращивания микроорганизмов на мелассной и зерно-картофельной барде, так же как большинство процессов получения кормовых дрожжей на других сырьевых источниках, включает следующие стадии: подготовку сырья и приготовление питательных сред, получение посевного материала, выращивание кормовых дрожжей, выделение и сгущение дрожжевой биомассы, ее витаминизацию и сушку.

Некоторые технологические особенности процесса выращивания микроорганизмов на мелассной и зерно-картофельной барде связаны в основном со свойствами данного вида сырья, а также с возможностью использования вторичной барды после отделения от жидкой фазы кормовых дрожжей.

Характеристика сырья

Барда — отход спиртового и ацетоно-бутилового производства; содержание сухих веществ в ней достигает

8—12%. В зависимости от качества исходного сырья и способов его переработки на заводах химический состав барды изменяется в широком диапазоне:

Соединения	Содержание в мелассной барде, % к СВ
Белок ($N \times 6,25$)	11—12
Несброженные сахара (РВ)	4—7
Глицерин	7—9
Карбоновые кислоты	13—20
Бетаин	8—10
Глутаминовая кислота	6—9
Другие аминокислоты	1—3
Гумины, меланоидины, глюкозиды, фенолы, жиры	10—15
Всего органических соединений	68—72
K_2O	12,0—15,0
Na_2O	2,5—3,5
CaO	0,2—1,3
P_2O_5	0,2—0,3
Другие неорганические соединения	10,5—11,9
Всего неорганических соединений	26—32

	Содержание в ацетоно-бутиловой барде, %
Сухие вещества	2,81—4,45
в том числе нерастворимые	1,05—1,30
Углеводы в пересчете на глюкозу (после гидролиза)	0,62—0,96
Азотсодержащие вещества	0,78—1,00
в том числе растворимые	0,70—0,96
Клетчатка	0,08—0,28
Зольные вещества	0,10—0,14
Прочие экстрактивные вещества (в том числе жир)	0,12—0,47

В табл. 22 приведен химический состав барды, полученной при переработке различных культур. Состав дается на отсепарированную послеспиртовую барду, почти не содержащую отработанных дрожжей.

Из усваиваемых кормовыми дрожжами форм углерода в наибольшем количестве в барде присутствуют карбоновые кислоты. Состав летучих и нелетучих карбоновых кислот, переходящих в барду из мелассы и другого сырья и образующихся при спиртовом брожении, разнообразен: в барде обнаружены молочная, уксусная, муравьиная, пропионовая, гликолевая и другие кислоты. В значительно меньшем количестве (4—7%) содер-

Таблица 22

Соединения	Содержание в зерно-картофельной барде (в %), полученной из				
	ржи	кукурузы	овса	ячменя	картофеля
Вода	92,7	92,4	93,1	92,9	95,0
Растворимые СВ	2,9	2,5	2,0	2,7	2,0
Редуцирующие вещества	0,4	0,5	0,3	0,4	0,2
Редуцирующие вещества после гидролиза	0,3	0,6	0,6	0,4	0,3
Крахмал	0,3	0,4	—	—	0,3
Пентозаны (в фильтрате)	0,5	0,3	0,2	0,4	0,4
Гемицеллюлозы	1,7	1,6	1,3	1,2	1,0
Клетчатка	0,5	0,3	0,8	0,7	0,2
Азот общий	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
в том числе в фильтрате	0,1	0,04	0,1	0,07	0,06
Зольные вещества	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4
в том числе в фильтрате	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Жир	—	0,7	0,9	0,5	—
Общее содержание СВ	7,3	7,6	6,9	7,1	5,0

жатся в барде несброженные сахара, включающие глюкозу, фруктозу, арабинозу, кестозу, рафинозу и др. Глицерин и незначительные количества этилового, изоамилового и некоторых других высших спиртов остаются в барде при перегонке бражки.

В мелассной и зерно-картофельной барде в небольших количествах имеются различные формы азота (растворимый, аминный, аммиачный). Хроматографическими методами анализа в барде обнаружены следующие аминокислоты: лейцин, аргинин, валин, глицин, тирозин, серин, аспарагин (следы), аргинин, фенилаланин, глутаминовая и γ-аминомасляная. Многие из них ассимилируются дрожжами. Однако преобладающая доза азотсодержащих веществ барды, бетаин и глутаминовая кислота дрожжами не усваиваются.

Общее количество углеродсодержащих веществ в 1 м³ мелассной барды с концентрацией сухих веществ 8—9% колеблется в пределах 25—30 кг. Соотношение углеродсодержащих веществ, усваиваемых дрожжами, в мелассной барде составляет, по усредненным данным, следующие величины (в кг/м³):

Карбоновые кислоты	12—13
Аминокислоты	2—3
Глицерин и другие спирты	6—7
Сахара	3—4
Прочие вещества	2—3

При использовании различных источников углерода дрожжи накапливают неодинаковое количество биомассы. Выход воздушно-сухих дрожжей в зависимости от источника углерода будет следующим (в кг дрожжей на 100 кг источника углерода):

Карбоновые кислоты	25—36
Редуцирующие сахара	40—45
Глюкоза	56,7
Этиловый спирт	69,0

Учитывая содержание этих источников углерода в барде, практический выход дрожжей с влажностью 10% можно принять равным 42—43 кг из 100 кг источников углерода, что соответствует выходу 11—13 кг сухих дрожжей из 1 м³ барды, содержащей 8—9% сухих веществ. Недостаток в барде легкоусваиваемых форм азота и фосфора восполняется питательными солями.

Для повышения выхода дрожжей в перерабатываемую барду, содержащую относительно небольшое количество источников углерода (это особенно относится к мелассной барде), добавляют дополнительные легкоусваиваемые углеродсодержащие вещества: свеклосахарную мелассу, кукурузный экстракт, гидрол, эфиро-альдегидные фракции. Однако такие добавки значительно повышают себестоимость кормовых дрожжей. Экономически выгодным является выращивание дрожжей на смеси барды и гидролизатов растительных отходов.

Послеспиртовая барда богата витаминами, в частности в мелассной барде обнаружены следующие витамины (в мг/г):

Рибофлавин	8
Пантотеновая кислота	39
Никотиновая кислота	21
Пиридоксин	30
Биотин	1,5
Фолиевая кислота	0,3

В значительных количествах в барде присутствуют соли калия, натрия, кальция, магния и микроэлементы: железо, марганец, медь, цинк, кобальт и др.

Послеспиртовая барда имеет pH 5,2—5,6.

Подготовка сырья для культивирования микроорганизмов

Горячая послеспиртовая барда перед поступлением в цех кормовых дрожжей дополнительно стерилизуется, освобождается от гипса и охлаждается. Стерилизация барды производится в секционном закрытом стерилизаторе непрерывного действия при температуре 90—98° С в течение 1 ч. При повышенном содержании CaO в мелассе (более 0,5—0,8%) горячая барда подкисляется до pH 4,0—4,5 и выдерживается при температуре 80—85° С по 1 ч попеременно в двух закрытых сборниках — декантаторах. Охлаждается барда в трубчатых или пластинчатых теплообменниках.

В случае проведения непрерывного процесса выращивания кормовых дрожжей из охлажденной барды сепарированием отделяют мертвые дрожжи. При периодическом и полунепрерывном процессах выращивания кормовых дрожжей мертвые дрожжи не отделяют.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на зерно-картофельной и мелассной барде

Состав питательной среды. Основой питательной среды для выращивания микроорганизмов является послеспиртовая барда, но она часто не содержит требуемого для нормальной жизнедеятельности дрожжей комплекса соединений. Поэтому в зависимости от состава барды ее обогащают различными питательными веществами.

Дополнительные углеродсодержащие продукты (мелассу, кукурузный экстракт или гидрол) добавляют при размешивании к горячей барде (в количестве 10 кг на 1 м³ барды) до стерилизации. Кислые гидролизаты с содержанием РВ 8—10% подаются непосредственно в дрожжерастильный чан.

Недостаток в барде усваиваемых форм азота и фосфора восполняется добавлением питательных солей и

минеральных кислот. Для интенсивного размножения дрожжей и обеспечения в дрожжах P_2O_5 на уровне 3—3,5%, N — 7,0—8,0% (в расчете на сухое вещество), а также с учетом некоторого остатка этих соединений в культуральной жидкости необходимо добавить (в кг на 1 м³ барды): ортофосфорной кислоты 0,9—1,2, или диаммонийфосфата 1—1,2, или суперфосфата (18%-ного) — 2,8—3,0; сульфата аммония 2,0—2,5.

Минеральные кислоты необходимы для поддержания pH культуральной жидкости на уровне 4,5—5,0, так как они замещают органические карбоновые кислоты, потребляемые в процессе культивирования. При использовании моногидрата серной кислоты расход составляет 8—10 кг на 1 м³ барды, или 550—650 кг на 1 т сухих дрожжей, при использовании соляной кислоты — 7—8 кг/м³, или 450 кг/т в расчете на 100%-ную кислоту.

Растворы питательных солей, водная вытяжка суперфосфата и растворы кислот готовят в отдельных емкостях и подают в определенном количестве к охлажденной барде.

Динамика потребления питательных веществ барды зависит от начальной концентрации в ней сухих веществ. При использовании неразбавленной барды (содержание сухих веществ 8—9%) 82—85% сухих веществ остаются неиспользованными, но даже разбавление барды в 2 раза повышает использование сухих веществ среды только на 25%, а 75% СВ остаются неутилизированными.

Исследования состава барды до и после процесса выращивания кормовых дрожжей показывают, что отдельные компоненты питательных веществ используются по-разному (табл. 23).

Наблюдаются различия и в скорости потребления отдельных соединений. Например, последовательность потребления низкомолекулярных окси-, моно- и дикарбоновых кислот при выращивании культур Candida guilliermondii и Rhodotorula utilis на барде свекловичной мелассы была следующей: сначала интенсивно потреблялась уксусная кислота, затем молочная, янтарная и лишь через большой промежуток времени — гликолевая. Эти данные свидетельствуют также о неодинаковой питательной значимости для микроорганизмов не только целых групп соединений, но и отдельных их составляющих.

Условия культивирования. Количество кислорода, не-

Таблица 23

Компоненты	Содержание, %		Процент потребления
	до выращивания	после выращивания в течение 12 ч	
Общие сухие вещества	8,3	7,0	15,7
Органические сухие вещества	6,1	4,2	31,2
Редуцирующие вещества	0,28	0,15	46,4
Карбоновые кислоты			
нелетучие	1,15	0,43	62,6
летучие	0,031	0,015	51,6
Глицерин	0,62	0,20	67,8
Азот общий	0,34	0,30	11,8
Бетаин	1,33	1,25	6,0
Глутаминовая кислота (после кислотного гидролиза)	0,48	0,43	10,1
Неорганические соединения	2,20	2,14	2,7

обходимое для синтеза биомассы дрожжей, зависит от используемых источников углерода. Теоретически на ассимиляцию дрожжами 1 кг глюкозы требуется около 0,77 кг кислорода, уксусной кислоты — 1,572 кг, янтарной кислоты — 1,558 кг. Так как основными источниками углерода в барде являются карбоновые кислоты, для их усвоения дрожжами требуется почти в 2 раза больше кислорода по сравнению со средами, содержащими углеводы. Следовательно, для получения заданного выхода кормовых дрожжей необходимо подавать такое количество воздуха, которое обеспечивало бы приблизительно на 1 кг потребленного источника углерода 1,5 кг растворенного кислорода.

Большое влияние на накопление биомассы оказывает pH питательной среды. Обычно pH регулируется добавлением серной кислоты. Наибольший выход биомассы дрожжей наблюдается при pH 5,5—6,0 — до 74,5 г/л, но при этом pH культуральная жидкость сильно вспенивается и условия отделения дрожжевой биомассы ухудшаются. Поэтому считается целесообразным поддерживать начальное значение pH среды на уровне 4,5—4,8, что обеспечивает выход дрожжей в среднем 65—69 г/л.

Температура культивирования также является очень важным фактором, влияющим не только на скорость размножения кормовых дрожжей, но и на развитие сопут-

ствующей микрофлоры. Послеспиртовая барда, как известно, является благоприятной средой для развития кислотообразующих микроорганизмов. Поэтому оптимальная температура выращивания кормовых дрожжей на барде устанавливается с учетом степени инфицирования культуры другими микроорганизмами при этих условиях. Обычно это 30—33° С, дальнейшее увеличение температуры влечет за собой снижение выхода биомассы.

Состав кормовых дрожжей, полученных выращиванием на зерно-картофельной (I) и мелассной (II) барде, следующий (в %):

	I	II
Влага	6—10	6—10
Сырой белок (N×6,25)	48—56	47—55
Углеводы	22—25	14—17
Жиры	2—5	2—5
Зола	7—9	8—10

Незаменимых аминокислот содержится в дрожжах (в г на 100 г белка):
триптофана 0,4—0,7, лизина 2,5—3,6, метионина 0,7—1,0, аргинина 1,4—2,6, гистидина 1,2—2,0, треонина 4,2—2,6; валина 3,0—2,6, изолейцина 2,3—5,1; лейцина 3,5—3,6, фенилаланина 2,4—3,1, цистина 0,4—0,6.

§ 5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

Известны различные способы переработки молочной сыворотки: сушка, получение лактозы, изготовление напитков и т. д. Из этих способов менее всего изучено применение сыворотки в качестве питательной среды для микробного синтеза белка и жиров.

Наличие в сыворотке легко усваиваемых микроорганизмами источников углеродного питания, а также ростовых факторов определяет ее использование в качестве питательной среды для выращивания микроорганизмов.

Характеристика сырья

При производстве молочных продуктов (сыра, творога, казеина) в процессе получения белкового сгустка из него выделяется растворитель, называемый молочной

сывороткой. В сыворотку переходит 50% сухих веществ молока.

Состав молочной сыворотки (в %) заметно варьирует (табл. 24) в зависимости от качества исходного сырья,

Таблица 24

Вид сыворотки	Сухие вещества	Белок	Жир	Лактоза	Зола
Подсырная	6,5—6,6	0,4—1,0	0,05—0,40	4,8	0,5—0,7
Творожная	5,9—6,0	0,5—1,0	0,2—0,3	4,0—4,7	0,6—0,7
Из-под кислотного казеина	6,9	0,9	0,3	4,7	—
Из-под копреципитата хлоркальциевого	5,5	0,2	—	4,7	—
Из-под копреципитата солянокислого низкокальциевого	5,5	0,3	—	4,5	—
Из-под копреципитата солянокислого среднекальциевого	5,3	0,2	—	4,5	—

характера готового продукта, способа отделения белка (сквашивание, действие органических и минеральных кислот или ферментативный способ).

В сухом веществе сыворотки основные компоненты распределяются следующим образом (в %): лактоза — 70, белковые вещества — 14,5, жир — 7,5; минеральные соли — 8.

Основным источником углерода в молочной сыворотке является лактоза (молочный сахар). Это — дисахарид, состоящий из двух остатков (*d*-глюкозы и *d*-галактозы) и являющийся специфическим продуктом любого лактирующего животного организма. Помимо лактозы в молочной сыворотке в небольших количествах содержатся в свободном состоянии глюкоза, галактоза, арабиноза, лактулоза и полисахарид амилоид.

Азотистые вещества сыворотки представлены белковыми и небелковыми органическими соединениями. На 90% белки молочной сыворотки состоят из альбуминов

и глобулинов. Казеин — основной белок молока, состоящий из α-, β-, γ- фракций, — не полностью выделяется в молочный продукт, в то время как γ-фракция, составляющая 3—15% от общего количества казеина, практически полностью переходит в молочную сыворотку.

Аминокислотный состав сывороточных белков представлен всеми незаменимыми аминокислотами. В состав небелковых азотистых веществ, составляющих 25—30% от общего количества азотистых веществ, входят (в мг %): свободные аминокислоты — 2,9; мочевина — 3,5; мочевая кислота — 11,3; креатин — 3,8; пуриновые основания — 2,8; креатинин — 1,2.

В молочной сыворотке содержится значительное количество органических кислот (молочной, уксусной, пропионовой, муравьиной, лимонной и некоторых других). За исключением лимонной, все органические кислоты сыворотки являются продуктами жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, развивающихся в молоке и сыворотке. В наибольшем количестве (от 0,5 до 0,8%) в сыворотке содержится молочная кислота, которая образуется в результате ферментативного гидролиза лактозы. Другие органические кислоты обнаруживаются в основном в творожной сыворотке, где в процессе получения творога принимают участие как гомо-, так и гетероферментативные молочнокислые микроорганизмы.

В молочной сыворотке может присутствовать некоторое количество минеральных кислот (соляной или серной), переходящих в нее при производстве пищевого и технического казеина, а также копреципитатов и казеинатов.

Минеральные вещества сыворотки представлены органическими (0,1—0,4%) и неорганическими (0,6—0,7%) солями калия, натрия, магния, кальция и др. В молочной сыворотке содержится (в % золы): K_2O — 30,3; Na_2O — 3,2; CaO — 20,1; MgO — 2,4; P_2O_5 — 22,4; Cl — 14,0; SO_3 — 2,6.

Всего в молочной сыворотке присутствует более 30 различных макро- и микроэлементов, больше, чем в любом другом естественном субстрате, используемом в качестве среды для выращивания микроорганизмов.

В сыворотку переходит большая часть водорастворимых витаминов молока (88% тиамина, 78 — аскорбино-

вой кислоты и 90% никотиновой кислоты) и часть жирорастворимых витаминов (11% ретинола и 32% токоферола). Содержание витаминов в молочной сыворотке (в мкг/кг) следующее:

Ретинол	0,02—0,04	Биотин	0,01—0,04
Токоферол	0,20—0,29	Парааминобензойная кислота	0,1
Филлохинон	0,04	Холин	165,0—400,0
Тиамин	0,37—0,45	Аскорбиновая кислота	4,7
Рибофлавин	1,8—2,5	Пантотеновая кислота	2,9—4,4
Пиридоксин	1,2—1,5		
Кобаламин	0,1—2,9		
Фолиевая кислота	0,19—0,8		
Никотиновая кислота	1,05—1,76		

Молочная сыворотка содержит значительное количество различных микроорганизмов и потому является нестабильным сырьем: ее нужно либо немедленно использовать, либо консервировать.

Использовать молочную сыворотку можно как добавку в корма сельскохозяйственных животных; для переработки на специальные напитки; для выделения из нее белков и использования их для обогащения пищевых продуктов и полуфабрикатов; для выделения лактозы; в качестве среды для микроорганизмов при получении молочной кислоты, спирта, кормовых дрожжей и других продуктов.

По статистическим данным, 48—88% всей сыворотки в мире используется на корм скоту, очень немного (0,5—4,0%) — для технических целей и 7—52% — на пищевые цели.

Скармливание молочной сыворотки в жидком виде животным не всегда целесообразно, так как при большом объеме производства встают вопросы ее хранения, транспортировки, предварительной обработки. Кроме того, при скармливании телятам и курам-несушкам сухой сыворотки в организме животного усваивается только 20% ее, что обусловлено неблагоприятным сочетанием в сухой сыворотке углеводов, белков и минеральных веществ.

В последнее время молочная сыворотка все чаще рассматривается как источник получения кормовых микробных масс для сельского хозяйства, т. е. применяется в качестве питательной среды для выращивания микроорганизмов.

Подготовка молочной сыворотки для выращивания микроорганизмов

В процессе подготовки сыворотки к выращиванию микроорганизмов избыток белка молочной сыворотки денатурируют и выпадающий осадок удаляют. Для осаждения белков используется термическая обработка (нагревание до 85° С и выдержка при этой температуре в течение 10 мин) с одновременным изменением pH среды до величины изоэлектрической точки осаждаемых белков. В зависимости от вида сыворотки для смещения реакции среды используют щелочные реактивы, молочную или соляную кислоты.

После осаждения и уплотнения белкового осадка отстаиванием в течение 1 ч жидкая фаза сыворотки отфильтровывается. Полученная осветленная молочная сыворотка используется для выращивания кормовых дрожжей. На осветленной молочной сыворотке выход биомассы выше, чем на необработанной (табл. 25).

Таблица 25

Сыворотка	Тепловая обработка	Выход белка, г/л	Потребление лактозы, %
Сычужная			
осветленная	Пастеризация	36,4	86,2
	Стерилизация	41,4	89,0
неосветленная	Пастеризация	28,2	78,5
	Стерилизация	30,8	84,1
Творожная			
осветленная	Пастеризация	39,5	80,3
	Стерилизация	40,3	97,9
неосветленная	Пастеризация	35,5	86,8
	Стерилизация	36,7	95,7

На выход белка влияет также тепловая обработка молочной сыворотки: выход белка тем выше, чем глубже тепловая обработка. Это связано не только с более полной коагуляцией белков, но и с эффектом стерилизации, так как на нестерильной сыворотке выход белка снижается за счет развития посторонней микрофлоры, в частности «диких» малопродуктивных видов дрожжей и бактерий.

Микроорганизмы — продуценты белка

Продуцентами белка на молочной сыворотке могут быть микроскопические грибы, хорошо использующие лактозу сыворотки как при поверхностном, так и при глубинном выращивании, в частности Penicillium roqueforti, Geotrichum candidum (Oidium lactis), Zygorynchus mcellery, Rhizopus oligosporus, Morchella.

Для увеличения продуктивности микроскопических грибов по белку, а также повышения содержания незаменимых аминокислот в биомассе целесообразно использовать смешанные культуры микроскопических грибов и бактерий, например Lactobacterium, Pseudomonas hermanii, E. coli.

Наибольшее распространение в качестве продуцентов белка на молочной сыворотке получили дрожжи. Например, дрожжи Saccharomyces fragilis ассимилируют лактозу на сыворотке как окислением, так и брожением. Известно большое количество видов дрожжей, усваивающих лактозу различными путями и вовсе не усваивающих лактозу, но дающих обильный рост на молочной сыворотке.

К активным продуцентам белка на молочной сыворотке относятся дрожжи Candida utilis (Torulopsis utilis var major), Candida tropicalis, Trichosporon cutaneum, Zygofarbospora marxiana, Zygosaccharomyces lactis, Candida humicola и др.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на молочной сыворотке

Состав питательной среды. У различных микроорганизмов, способных расти на молочной сыворотке, наблюдаются различные пути усвоения питательных веществ. Часть микроорганизмов ассимилируют лактозу окислением, другие — окислением и брожением. Часто встречаются микроорганизмы, дающие хороший рост на сыворотке, но не усваивающие лактозу. Такие различия в обмене веществ у микроорганизмов на молочной сыворотке связаны с различными ферментными системами у них.

По-видимому, клетки микроорганизмов, способных к жизнедеятельности как в аэробных, так и в анаэробных условиях, при аэри-

ровании среды запасают некоторое количество энергии для использования ее в анаэробных условиях. Поэтому скорость роста и накопления биомассы у этих микроорганизмов несколько ниже, чем у дрожжей, окисляющих лактозу. А микроорганизмы, ассимилирующие лактозу только окислением, всю энергию расходуют на конструктивный обмен и, следовательно, накапливают большее количество биомассы за то же время.

При выращивании микроорганизмов на молочной сыворотке следует учитывать физиологические особенности продуцентов и порядок ассимиляции ими из среды кислот (летучие кислоты, затем молочная кислота и, наконец, лактоза).

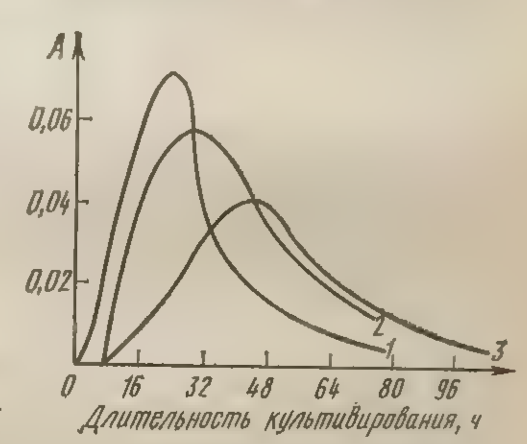


Рис. 65. Влияние на относительную скорость роста *A* T. candida ФК концентрации лактозы (в %):

1 — 13,4; *2* — 16,8; *3* — 23,9.

Большое влияние на накопление биомассы микроорганизмами оказывает содержание в молочной сыворотке сухих веществ. Исходная сыворотка имеет концентрацию СВ 5,3—6,9%. При выращивании микроорганизмов сыворотку можно разбавить в 5—6 раз или же сконцентрировать в 2—2,5 раза. При непрерывном культивировании целесообразно работать на разбавленной сыворотке, при периодическом способе лучшие результаты получаются на концентрированной сыворотке.

Увеличение содержания в среде лактозы (до 12—13%) вызывает пропорциональное повышение концентрации биомассы в среде, но если концентрация лактозы достигает 15—18%, то наблюдается торможение прироста дрожжей, а при содержании лактозы 20% рост дрожжей полностью прекращается.

В настоящее время селекционирован новый штамм дрожжей, растущий на сгущенной молочной сыворотке с концентрацией лактозы до 24%. Этот штамм Torulopsis candida ФК — осмофильный, обладает устойчивостью к высоким концентрациям лактозы и высокой продуктивностью (рис. 65).

При культивировании дрожжевых микроорганизмов на нативной молочной сыворотке получается биомасса с низ-

ким содержанием белка (10—20%) при довольно большом процентном содержании углеводов и зольных элементов. Внесение в сыворотку дополнительных источников азота в виде мочевины, сернокислого аммония и аммиака в количестве до 1% незначительно увеличивает выход биомассы (в среднем на 10%), но способствует повышению содержания белка в дрожжах в 4—5 раз.

Рис. 66. Зависимость относительной скорости образования биомассы *A* T. candida ФК от интенсивности аэрации среды (в г O_2 на 1 л/ч):

1 — 0,4; *2* — 2,16; *3* — 3,49; *4* — 5,23. Содержание лактозы в среде 4,56%.

Условия культивирования. Потребность в кислороде при культивировании микроорганизмов на молочной сыворотке зависит от его расхода на окисление отдельных источников углеродного питания, содержащихся в этом сложном органическом субстрате. Окисление лактозы при синтезе клеточного вещества происходит по уравнению $C_{12}H_{22}O_{11} + 4O_2 \rightarrow 4CO + 3H_2O + 8CH_2O$. Для окисления 40 г лактозы, содержащейся в 1 л молочной сыворотки, необходимо 14,5 г кислорода, или 10,5 л воздуха. Фактическая же потребность микроорганизмов в кислороде выше, так как она складывается из расхода на окисление не только лактозы, но и других компонентов, в частности молочной кислоты.

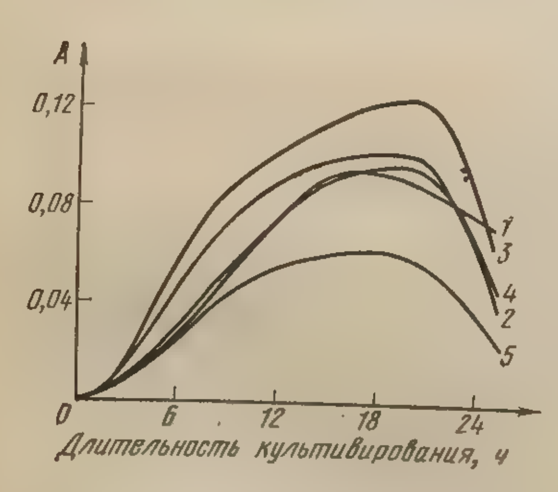


Рис. 67. Зависимость относительной скорости образования биомассы *A* T. candida ФК от величины pH среды:

1 — 4,5; *2* — 5,0; *3* — 5,5; *4* — 6,0; *5* — 7,0.

При культивировании микроорганизмов на скорость образования биомассы в значительной степени влияет интенсив-

ность аэрации среды (рис. 66). Причем до определенной величины аэрации (3,49 г O_2 на 1 л/ч) наблюдается повышение величины относительной скорости роста, а затем она снижается. Следовательно, чрезмерная аэрация в определенные периоды роста микроорганизма может отрицательно сказаться на накоплении биомассы. Объем подаваемого воздуха необходимо изменять в зависимости от фазы развития дрожжей.

Так как большинство микроорганизмов — продуцентов белка, растущих на молочной сыворотке, являются мезофильными, они наиболее интенсивно развиваются в пределах температур 23—32° С.

Молочная сыворотка как субстрат для выращивания микроорганизмов обладает высокой буферной емкостью. Поэтому в процессе роста микроорганизмов на сыворотке без добавления минеральных источников сдвиг pH в щелочную зону происходит очень медленно. Буферность молочной сыворотки и преимущественное потребление дрожжами кислых компонентов среды (молочной кислоты, цитратов, растворимых белков) определяют несколько более высокий по сравнению с другими средами предел оптимальной величины pH в интервале 4,5—6,5. Для дрожжей T. candida ФК оптимальная величина pH для накопления биомассы составляет 5,5 (рис. 67).

Глава 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА — НА УГЛЕВОДОРОДНОМ СЫРЬЕ

В нашей стране имеются значительные запасы углеводородного сырья, использование которого в качестве источника углерода при промышленном производстве микробного кормового белка обладает рядом преимуществ, прежде всего, за счет его бо́льшей стабильности, транспортабельности и технологичности. Предприятия по производству микробного кормового белка размещаются вблизи нефтеперерабатывающих заводов. Это создает благоприятные условия для их ускоренного строительства и надежной эксплуатации. В качестве исходного сырья для производства кормовых дрожжей могут быть

использованы жидкие очищенные парафины, нефтяные дистилляты, природный газ, метиловый и этиловый спирты, карбоновые кислоты и др. Выбор конкретных нефтепродуктов в качестве сырья определяется содержанием в них *н*-алканов с определенной длиной углеродной цепи, экономичностью процесса биосинтеза, стоимостью сырья и учетом требований к качеству микробного кормового белка, установленных Министерством здравоохранения СССР.

§ 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЖИДКИХ УГЛЕВОДОРОДАХ НЕФТИ

Первые работы по использованию нефтепродуктов в качестве сырья для выращивания микроорганизмов были начаты с жидкими очищенными углеводородами C_{11}—C_{18}, хорошо усваиваемыми микроорганизмами.

Характеристика сырья

Легче всего дрожжи потребляют низкомолекулярные парафины C_{11}—C_{14}, среднее положение занимают алканы C_{15}—C_{18} и труднее всего потребляются высокомолекулярные *н*-алканы. Например, скорость потребления *н*-ундекана в 10 раз выше скорости потребления *н*-октадекана и в 25 раз превышает скорость потребления алканов C_{21}—C_{24}. При этом с увеличением числа атомов углерода в цепи повышается продуктивность дрожжей. Однако для промышленного биосинтеза белковых веществ тяжелые (от C_{25} и выше) парафиновые углеводороды непригодны, так как при обычной температуре это твердые вещества и использование их связано с рядом технических трудностей. Кроме того, парафиновые углеводороды, кипящие при 370° С и выше, содержат канцерогенные полициклические углеводороды (3,4-бензпирен, метиллопрен и др.), кипящие при тех же температурах.

Малопригодными для питания дрожжей оказались углеводороды с нелинейной молекулой (изопарафиновые, циклопарафиновые и ароматические углеводороды). То же относится и к легким (C_2—C_8) парафиновым углеводородам.

Выращивать бактериальные культуры можно на средах, содержащих в качестве единственного источника

углерода *н*-парафины C_1—C_{30}, *н*-олефины C_6—C_{30}, а также нефтяные фракции, в частности нефтяные дистилляты, выкипающие при 190—400° С, и др. Самые хорошие результаты дают фракции *н*-парафинов C_{11}—C_{30}.

Для получения кормовых дрожжей, отвечающих современным требованиям Министерства здравоохранения СССР, в частности ограничивающих содержание остаточных углеводородов в дрожжах не более 0,1% при отсутствии ароматических углеводородов и содержании липидов до 5%, необходимо:

применять для выращивания дрожжей жидкие парафины облегченного фракционного состава и высокой степени очистки;

при использовании фракций парафинов обычной чистоты проводить экстрактивную очистку дрожжей органическими растворителями.

Для проведения экстрактивной очистки биомассы (обычно легкокипящими углеводородными растворителями) потребуется сооружение дополнительных установок, что повысит себестоимость продукта на 15%, а удельные капиталовложения — на 10—12%. Поэтому в настоящее время первый вариант более экономичен.

Для получения кормовых дрожжей широко используются жидкие очищенные парафины, температура начала кипения которых не ниже 200 и не выше 280° С; 95% парафина выкипает при температуре не выше 320° С. При выращивании микроорганизмов на таких парафинах выход биомассы увеличивается примерно на 15—20% по сравнению с выращиванием на жидких парафинах фракции, кипящей при температуре 240—360° С. Удельный расход этих парафинов составляет 1,1 т на 1 т белковых препаратов.

В настоящее время предусматривается выпуск жидких парафинов с температурой начала кипения 200—270° С; 50% этих парафинов выкипает до 300° С, а 98% — до 354° С. Удельный расход таких парафинов составляет 1,2 т на 1 т белковых препаратов. Они уступают по качеству жидким парафинам с температурой кипения 200—320° С.

Высокоочищенные жидкие парафины, выкипающие в пределах температур 200—320° С, с содержанием *н*-алканов не менее 99% и ароматических углеводородов не более 0,01% наиболее эффективны для производства

белковых препаратов. Полученные при переработке высокоочищенных парафинов белковые препараты содержат не более 0,1% остаточных углеводородов, при этом удельный коэффициент расхода сырья снижается до 1,0.

Экономичным и доступным сырьем для производства кормовых дрожжей могут служить прямогонные дизельные фракции парафинистой и высокопарафинистой нефти.

Микробиологическая депарафинизация прямогонных дистиллятов позволяет осуществлять комплексную переработку сырья, при этом одновременно получается три целевых продукта: кормовой белок, технический биожир и компонент дизельного топлива с пониженной температурой застывания. Различная по составу нефть определяет не только качество и выход кормовых дрожжей, но и качество депарафинизированного дистиллята. Наиболее пригодны для производства кормовых дрожжей в техническом и экономическом отношениях парафинистые и высокопарафинистые дистилляты нефти, выкипающие при 240—360° С и содержащие не менее 15% комплексообразующих углеводородов. Более низкое содержание комплексообразующих углеводородов делает производство кормовых дрожжей неэффективным.

В процессе производства кормовых дрожжей на нефтяных дистиллятах возникает ряд трудностей, в частности разделение многокомпонентной системы дрожжи — вода — нефтепродукт, очистка депарафинизированного компонента дизельного топлива от продуктов жизнедеятельности дрожжей, очистка готового продукта от остаточных углеводородов, присутствующих в биомассе в количестве 2—4%.

Методы выделения и очистки сырья

Существует три основных технологических метода выделения жидких парафинов из соответствующих нефтяных фракций: низкотемпературная кристаллизация в присутствии избирательных растворителей; депарафинизация при помощи карбамида и адсорбция на цеолитах (молекулярных ситах).

Низкотемпературная кристаллизация. Метод заключается в кристаллизации высококипящих *н*-алканов при постепенном охлаждении нефтяных фракций. Для увели-

чения селективности данного метода разделения кристаллизацию *н*-алканов осуществляют из растворов нефтяной фракции в легкокипящих избирательных растворителях, например в смеси ацетона, бензола и толуола. Продукт, выделяемый из дизельных фракций этим методом, содержит до 98% *н*-алканов C_{14}—C_{24}, около 0,5% ароматических углеводородов, он начинает кипеть при температуре 290° С.

Карбамидная депарафинизация. Метод основан на неодинаковой способности различных углеводородов образовывать твердый комплекс с молекулами карбамида. Наиболее легко образуют комплекс высокомолекулярные *н*-парафины, несколько труднее — низкомолекулярные. Разветвленные изопарафины, ароматические углеводороды и нафтеновые углеводороды с длинными боковыми цепями практически не образуют комплексов с карбамидом.

В общем виде процесс карбамидной депарафинизации включает следующие операции: получение карбамидного комплекса (комплекс-сырец, имеющий вид белой сметанообразной массы); отделение комплекса от жидкой фазы на вакуум-фильтрах либо декантацией и центрифугированием; промывку комплекса для отделения адсорбированных на его поверхности молекул ароматических углеводородов и смол, а также механически увлеченного исходного сырья (в качестве промывного агента используют изооктановые фракции, метилэтилкетон, депарафинизированную фракцию, кипящую при температуре 90—120° С, и другие бензиновые фракции); разрушение комплекса; получение *н*-парафинов и выделение карбамида для повторного использования в процессе.

Агентами, используемыми для разрушения комплекса, могут быть: растворители только углеводородного комплекса (бензол, бензиновые фракции и т. д.), при этом карбамид остается нерастворенным и легко отделяется; растворители карбамида (вода, водные растворы низших спиртов), при этом углеводородный комплекс не смешивается с растворителем и легко отделяется; растворители, в различной степени растворяющие как карбамид, так и *н*-парафины.

Существует несколько схем процесса карбамидной депарафинизации, различающихся характеристикой сырья, агрегатным состоянием карбамида, природой вводимых

в реакцию активаторов и растворителей, способами отделения жидкой фазы, промывки и разрушения комплекса. Одна из схем процесса депарафинизации дизельного топлива водно-спиртовым раствором карбамида представлена на рис. 68. По этой схеме раствор карбамида в смеси изопропанол — вода в объемном соотношении от 1 : 1 до 1 : 4 смешивается с дизельной фракцией

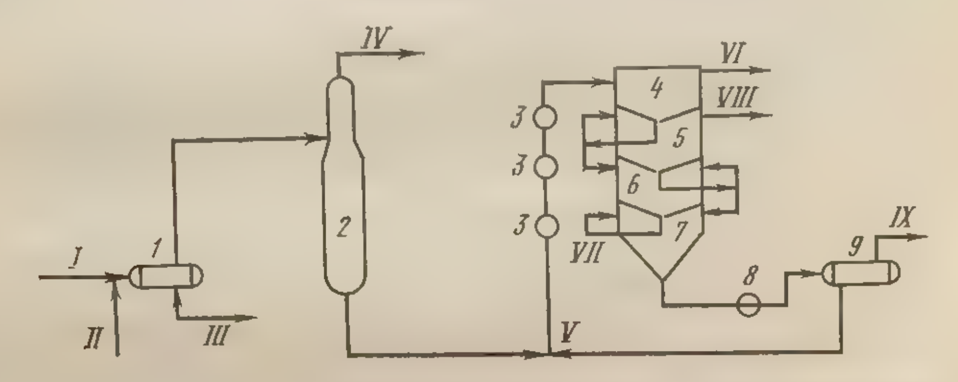


Рис. 68. Схема депарафинизации дизельного топлива водно-спиртовым раствором карбамида:

1 — отстойник слабого раствора спирта; *2* — колонна укрепления спирта; *3* — реакторы (10 шт.); *4* — отстойник суспензии комплекса и раствора дизельного топлива; *5*, *6*, *7* — промывные секции отстойника; *8* — подогреватель; *9* — отстойник растворов карбамида и парафина; потоки: *I* — сырье; *II* — изопропиловый спирт; *III* — слабый раствор изопропилового спирта; *IV* — пары воды и изопропилового спирта; *V* — раствор карбамида; *VI* — раствор депарафинированного топлива; *VII* — свежая промывная фракция; *VIII* — насыщенная промывная фракция; *IX* — раствор парафина.

нефти и поступает в отстойник слабого раствора спирта *1*. Далее верхний слой смеси направляется в колонну *2*, где удаляется избыток воды. Из колонны смесь поступает в систему реакторов *3*, куда дополнительно подается раствор карбамида. В результате реакции комплексообразования, протекающей при температуре 25—35° С в течение 40—60 мин, получается смесь, состоящая из комплекса депарафинизированного продукта и истощенного раствора карбамида. Смесь подается в отстойник *4*, где отделяется верхний слой — депарафинизированный продукт. Нижний слой поступает в промывные секции отстойника *5*, *6*, *7*. Комплекс промывается растворителем и поступает на разложение при температуре 60—75° С в подогреватель *8*. Из подогревателя смесь парафина с раствором карбамида поступает в отстойник *9*. Раствор парафина из верхней части отстойника направляется на регенерацию, а раствор карбамида из нижней части отстойника возвращается в процесс.

Выход парафинов, выкипающих при температурах 240—360° С, составляет 11—17% от массы вводимого сырья в зависимости от его качества. Процесс позволяет получать продукт, содержащий 93–96% некомплексообразующих и 0,5—1,0% ароматических углеводородов.

Адсорбция на молекулярных ситах. Адсорбция на молекулярных ситах (цеолитах) определяется размером окон, или каналов, ведущих в адсорбционные полости, поэтому цеолит может адсорбировать вещества, размеры молекул которых меньше диаметра пор цеолита. В химической технологии используются в основном синтетические цеолиты типов NaA, CaA, CaX, NaX, различающиеся размером окон в структуре: от 0,4 нм у NaA до 0,9—1,2 нм — у NaX.

Для получения *н*-парафинов большое распространение получили парофазные процессы выделения на цеолитах. Сырье при давлении $0{,}275 \cdot 10^5$ Па подогревается до температуры 315—400° С и в паровой фазе подается на цеолит для адсорбции *н*-парафинов. После насыщения адсорбента в одном адсорбере питание переключается на другой адсорбер, а слой адсорбента подвергается продувке *н*-гексаном, чтобы освободить пространство между гранулами цеолита от примесей. Далее адсорбер переключается на десорбцию, в результате которой за счет снижения парциального давления *н*-гексан вытесняет большую часть адсорбированных *н*-парафинов. Смесь *н*-гексана и тяжелых *н*-парафинов подается в ректификационную колонку для разделения. Такая же колонка служит для разделения смеси *н*-гексана и депарафината. Метод позволяет получать *н*-парафины C_4—C_{22} концентрацией до 99% и выше, с содержанием ароматических углеводородов до 0,25% при степени извлечения из сырца до 97—98%.

Разработан также способ выделения *н*-парафинов адсорбцией на молекулярном сите с использованием сильноадсорбирующегося десорбента, содержащего аммиак. Процесс включает двухстадийную адсорбцию *н*-парафинов в присутствии газа, содержащего водород, при температурах от 300 до 400° С и давлениях от 0,5 до 1,0 МПа. Десорбция проводится при тех же температуре и давлении. Метод обеспечивает получение *н*-парафинов 98—99%-ной чистоты с содержанием 0,4—

0,8% ароматических углеводородов при выходе более 95%.

Все современные методы выделения жидких парафинов не обеспечивают необходимой чистоты продукта, содержание ароматических углеводородов в них находится в пределах 0,25—2,0%. Необходимая дополнительная очистка парафинов может производиться как химическими (сернокислотная, гидрогенизационная очистка и озонирование), так и физическими (адсорбция и экстракция) методами.

Сернокислотная очистка. Применение серной кислоты концентрацией 97—98,5% недостаточно эффективно вследствие снижения ее концентрации в процессе обработки. Применение олеума, содержащего 20—25% свободного серного ангидрида, позволяет снизить содержание ароматических углеводородов с 1,4—2,5% до 0,2—0,4% при расходе олеума около 7—10% на исходный парафин. Метод технологически прост, не требует больших капитальных затрат, однако потери продукта и расход олеума на обработку велики, кроме того, появляется проблема утилизации кислых гудронов, выход которых составляет 25—35%.

Гидрогенизационная очистка. Сущность процесса гидрирования заключается в превращении ароматических углеводородов в нафтеновые при повышенном давлении (до 6,0 МПа) в присутствии катализаторов. Процесс имеет высокий выход, относительно низкие эксплуатационные затраты, но предъявляет повышенные требования к качеству исходного сырья: чтобы исключить возможность изомеризации *н*-алканов, необходимо использовать сырье с содержанием *н*-парафинов не менее 99%. Так как в нашей стране еще не налажено производство жидких парафинов такого качества, промышленного внедрения способ пока не получил.

Озонирование. Метод заключается в превращении под действием озона или озонсодержащих газов (озонированных воздуха и кислорода) при температуре 60° С ароматических углеводородов в твердые озониды, выпадающие в осадок и легко отделяемые фильтрацией или перегонкой. Одновременно с ароматическими углеводородами при этом методе выделяется основное количество сернистых соединений. Метод технологически прост, не нарушает изомерного состава продукта, не вносит в

продукт минеральных примесей. Недостатком метода является низкая эффективность: после обработки продукт содержит 0,15—0,30% остаточных парафинов.

Адсорбционная очистка. Сущность процесса непрерывной адсорбционной деароматизации жидких парафинов заключается в непрерывном противоточном контактировании раствора сырья в бензине (используется фракция бензина, кипящая при температуре 80—120° С, содержащая не более 3% ароматических углеводородов) с движущимся потоком мелкозернистого адсорбента (применяется синтетический мелкозернистый алюмосиликатный адсорбент). Метод отличается сложностью и трудоемкостью адсорбционных процессов, обеспечивает получение продукта, содержащего 0,3—0,5% ароматических парафинов.

Экстракционная очистка. Метод заключается в глубокой деароматизации жидких парафинов в результате избирательной жидкостной экстракции растворителями. Метод имеет хорошие технико-экономические показатели, обладает рядом преимуществ: не образует побочных трудноутилизируемых продуктов (как при сернокислотной очистке); растворители легко регенерируются, практически не ограничивается исходное содержание неароматических углеводородов (как при гидрогенизационном методе); не требуется сложной аппаратуры (как для адсорбционного метода); полициклические ароматические соединения удаляются практически полностью.

В качестве селективных растворителей могут быть использованы триэтиленгликоль, нитропарафины, диметилформамид, фурфурол, метилпирролидон (НМП). Использование фурфурола в экстракционных аппаратах с 20 теоретическими ступенями контакта позволило снизить содержание ароматических углеводородов с 3,8—3,0 до 0,05%. Эксперименты по очистке жидких парафинов НМП на полупроизводственной установке непрерывной противоточной экстракции показали возможность получения очищенных парафинов, содержащих менее 0,01% ароматических углеводородов.

Микроорганизмы — продуценты белка

Дрожжи, способные потреблять углеводороды, широко распространены не только в почвах нефтепромысловых районов, на участках вблизи бензиновых колонок

и т. д., но и в полевых и огородных почвах, почвах гористых местностей, в речной и озерной воде и др.; причем дрожжей, потребляющих углеводород, в почвах, где нет углеводородов, содержится не меньше, чем в почвах, загрязненных нефтью.

Однако наибольшей способностью потреблять углеводороды обладают штаммы, которые выделены из загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв, воды и других субстратов.

Наибольшей способностью утилизировать углеводороды обладают аспорогенные дрожжи семейства Cryptococcaceae (по систематике Лоддер и Крегер ван Рей), особенно дрожжи рода Candida. Из них наиболее часто используются в промышленности представители видов C. tropicalis, C. guilliermondii, C. lipolytica, C. robusta, C. pelliculosa, C. scotii, C. rugosa.

Довольно широко распространенными углеводородпотребляющими дрожжами являются представители родов Torulopsis и Rhodotorula. Наиболее известны среди них T. colliculosa, T. dattila, T. famata, T. sake, Rh. glutinis, Rh. gracilis. Из культур, относящихся к другим родам семейства Cryptococcaceae, найдены лишь немногие штаммы, растущие на углеводородах: отдельные штаммы родов Trychosporon, Brettanomyces и Cryptococcus.

На углеводородных субстратах хорошо развиваются, накапливая биомассу, бактерии видов Pseudomonas aeryginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas methanica, Pseudomonas desmolyticum, Pseudomonas pseudomonallei, Pseudomonas ligustri, Pseudomonas orvilla, Nocardia opaca, Nocardia carolina, Nocardia rubra, Micrococcus cereficans, Mycobacterium phlei, Mycobacterium paraffinicum, Alcaligenes sp., Cellumonas galba, Brevibacterium sp., Corynebacterium sp.

Для микробиологической депарафинизации нефтяных продуктов могут использоваться дрожжи родов Candida, Cryptococcus, Hansenula, в частности виды Candida lipolytica, Candida tropicalis, Candida utilis, Candida pulcherrima, Cryptococcus lipolytica, Hansenula anomala, а также микроскопический гриб Endomyces. Кроме дрожжей для депарафинизации дизельного топлива используются бактерии родов Pseudomonas или Nocardia, выделенные из воды или ила отстойников очистных сооружений, которые являются обычной средой их обитания.

В последние годы для депарафинизации нефтяных продуктов предложены и другие микроорганизмы: Bacillus subtilis, Bac. megatherium, Pseudomonas ligustis, Pseudomonas pseudomonallei, Pseudomonas oroilla, Alcaligenes sp., Cellulomonas galga, Brevibacterium paurametabolum.

Большое внимание уделяется учеными многих стран поиску термофильных микроорганизмов, способных утилизировать углеводороды. Одним из преимуществ использования таких микроорганизмов для производства белка является, по-видимому, возможность решения проблемы охлаждения ферментатора. Другое преимущество связано с возможностью ведения процесса без соблюдения асептических условий, так как количество микроорганизмов, способных расти на углеводородах при температуре около 60° С, весьма ограничено.

На жидких парафинах хорошо развиваются многие виды дрожжей, принадлежащие к роду Candida. Они накапливают сравнительно большое количество белка (от 45 до 60% и более) при высокой скорости протока (от 0,16 до 0,22 $ч^{-1}$) с экономическим коэффициентом 84—103% (табл. 26).

Таблица 26

Вид дрожжей	Скорость протока D, $ч^{-1}$	Экономический коэффициент η, %	Содержание белка, %
C. tropicalis	0,20	94,4	58,8
C. guiliermondii	0,22	84,6	53,5
C. lipolytica	0,18	101,7	47,6
C. pelliculosa	0,20	103,0	55,0
C. robusta	0,22	84,0	53,4
C. intermedia	0,16	87,1	51,0
C. rugosa	0,20	98,5	47,2
C. arborea	0,20	99,7	51,0
C. reukaifii	0,18	91,0	45,3

По технологическим и физиологическим признакам наилучшими показателями обладают дрожжи Candida guiliermondii, которые в нашей стране начиная с 1964 г. используются в качестве основной промышленной культуры. По сравнению с другими видами дрожжей C. guiliermondii обладает большой выживаемостью при оптимальных температурах роста. Эта культура в процессе

роста выделяет метаболиты, ингибирующие рост других микроорганизмов, что позволяет достаточно легко поддерживать асептические условия ее выращивания. Дрожжи C. guiliermondii отличаются высокой степенью вариабельности на изменение ряда параметров культивирования: кислотности среды, концентрации азота, фосфора, серы и других компонентов среды. Поэтому в производстве существует и хорошо работает ряд мутантных штаммов дрожжей C. guiliermondii, выращиваемых в промышленных ферментаторах со скоростью протока 0,33 $ч^{-1}$ с экономическим коэффициентом от 90 до 120%.

Учитывая особенности основного источника углерода, рассмотрим возможные пути окисления *н*-алканов микроорганизмами.

Пути усвоения *н*-алканов микроорганизмами

В отличие от углеводного обмена, где кислород служит только конечным акцептором электронов в дыхательной цепи, при окислении *н*-алканов кислород включается в молекулу промежуточных продуктов в самых первых реакциях.

Основной путь окисления *н*-алканов дрожжами условно можно разбить на 3 этапа.

I этап — монотерминальное окисление, т. е. окисление одной из концевых групп *н*-алканов. Существует 2 принципиально различных пути биологического окисления. Один заключается в активации водорода и отщеплении его от субстрата — дегидрирование субстрата (рис. 69). Другой путь состоит в присоединении кислорода воздуха непосредственно к субстрату — оксигенация субстрата (рис. 70).

Механизм действия ферментов, окисляющих углеводороды по обоим путям биологического окисления, состоит в сопряженном окислении молекулярным кислородом парафина и другого внутриклеточного восстановителя (обычно НАД·Н или НАДФ·Н): $R{-}CH_2{-}CH_3 + (O) \rightarrow$

$$\rightarrow R{-}CH_2{-}CH_2OH \xrightarrow[-2H]{} R{-}CH_2{-}CHO \xrightarrow{+HOH} R{-}CH_2{-}$$

$${-}COOH.$$

Активация молекулярного кислорода осуществляется путем сопряжения окисления двух субстратов — НАД·Н (или НАДФ·Н) и парафина. Один атом кислорода со-

единяется с парафином (оксигенация субстрата), другой — с активированным водородом в форме НАД·Н (или НАДФ·Н) и протоном с образованием воды. Таким образом, два пути биологического окисления в данной ферментативной реакции протекают одновременно. В результате образовавшаяся в качестве конечного продук-

$CH_3-(CH_2)_4-CH_2-CH_3$

↑↓ НАД → НАД·H_2 *Углеводороддегидрогеназа* $+Fe^{2+}$

$CH_3-(CH_2)_4-CH=CH_2$

↓ $+O_2+Fe^{2+}$

$CH_3-(CH_2)_4-CH-CH_2$ (эпоксид, O)

↓ НАД·H_2 → НАД *(Олефинредуктаза?)*

$CH_3-(CH_2)_4-CH_2-CH_2OH$

↓ НАД → НАД·H_2 *(Гептанолдегидрогеназа)*

$CH_3-(CH_2)_4-CH_2-CHO$

↓ НАД → НАД·H_2 *(Гептальдегидрогеназа)* $+Fe^{2+}+H_2O$

$CH_3-(CH_2)_4-CH_2-COOH$

Рис. 69. Схема окисления углеводородов через стадию дегидрогенизации.

та монокарбоновая кислота имеет то же число углеродных атомов, что и исходный *н*-алкан.

Окисление углеводородов микробиологическим путем протекает в условиях доступа свободного кислорода:

$$R-CH_2-CH_3+(O)\rightarrow R-CH_2-CH_2OH\xrightarrow[-2H]{}R-CH_2-$$

$$-CHO\xrightarrow{+HOH}R-CH_2-COOH.$$

В зависимости от того, к какому атому углерода присоединяется кислород, возникают различные продукты (рис. 71).

Монотерминальное окисление известно как основной путь деградации *н*-алканов. В редких случаях наблюдается атака двух конечных метильных групп молекулы *н*-алкана — детерминальное окисление. При этом одновременно с концевым окислением происходит окисление углеводородного атома, занимающего α-положение по отношению к метильной группе:

$$\underset{\leftarrow}{R} - \underset{\delta}{CH_2} - \underset{\gamma}{CH_2} - \underset{\beta}{CH_2} - \underset{\alpha}{CH_2} - CH_3.$$

$$2CH_3-(CH_2)_{14}-CH_3+2O_2$$
$$\downarrow$$
$$2CH_3-(CH_2)_{14}-CH_2OOH$$
$$\downarrow$$
$$2CH_3-(CH_2)_{14}-CH_2OH$$

$$CH_3-(CH_2)_{14}-\overset{H}{\underset{|}{C}}=O \xrightarrow{+H_2O} CH_3-(CH_2)_{14}-\overset{H}{C}\begin{matrix}OH\\OH\end{matrix} \xrightarrow{-H_2} \left[CH_3-(CH_2)_{14}-C\begin{matrix}\nearrow O\\ \searrow O\end{matrix}\right]H$$

$$CH_3-(CH_2)_{14}-CH_2OH$$

$$CH_3-(CH_2)_{14}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-(CH_2)_{15}-CH_3 + H_2O$$

Рис. 70. Схема окисления углеводородов через стадию оксигенации.

II этап — дальнейший распад углеродной цепи (после образования кислот) — менее специфичен, это известный путь β-окисления жирных кислот, т. е. окисления атома углерода, находящегося в β-положении по отношению к карбоксильной группе:

$$R - \underset{\delta}{CH_2} - \underset{\gamma}{CH_2} - \underset{\beta}{CH_2} \,\vdots\, \underset{\alpha}{CH_2} - COOH.$$

В ходе α-окисления в качестве промежуточных продуктов образуются последовательно укорачивающиеся

(на 2 углеродных атома) ацильные производные коэнзима А, а итогом процесса является образование соответствующего числа молекул ацетил-КоА.

III этап — превращения ацетил-КоА, связанные с реакциями цикла трикарбоновых кислот (ЦТК).

В настоящее время убедительно показано, что рост микроорганизмов на *н*-алканах, так же как и на ацетате,

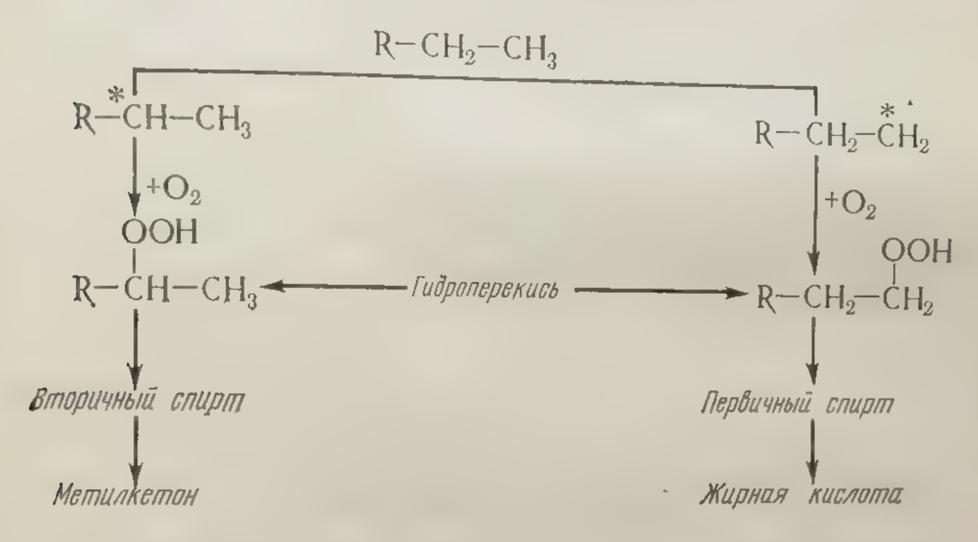


Рис. 71. Суммарная схема первого этапа окисления углеводородов микроорганизмами.

обеспечивается благодаря функционированию наряду с циклом трикарбоновых кислот глиоксилатного цикла (рис. 72).

Ключевые реакции цикла — расщепление изоцитрата до сукцината и глиоксилата, катализируемое изоцитратлиазой, и образование малата из глиоксилата и ацетил-КоА под действием малатсинтетазы. Продукты, синтезируемые в результате функционирования глиоксилатного цикла, с одной стороны, служат строительным материалом для синтеза клеточных компонентов (глюконеогенез, синтез аминокислот), с другой стороны, обеспечивают непрерывность работы цитратсинтетазной реакции (поставка оксалоацетата для конденсации с ацетил-КоА в цитрат). При росте на глюкозе глиоксилатный цикл существенного значения не имеет, что, по-видимому, связано с достаточным поступлением оксалоацетата в ЦТК другим путем (карбоксилирование фосфоенолпирувата и пирувата).

Различие реакций окисления молекул *н*-алкана и глюкозы позволяет предположить, что микроорганизмы, развивающиеся на данных источниках углерода, имеют различные ферментные комплексы. Поскольку ферментные системы, ответственные за окисление углеводородов, на-

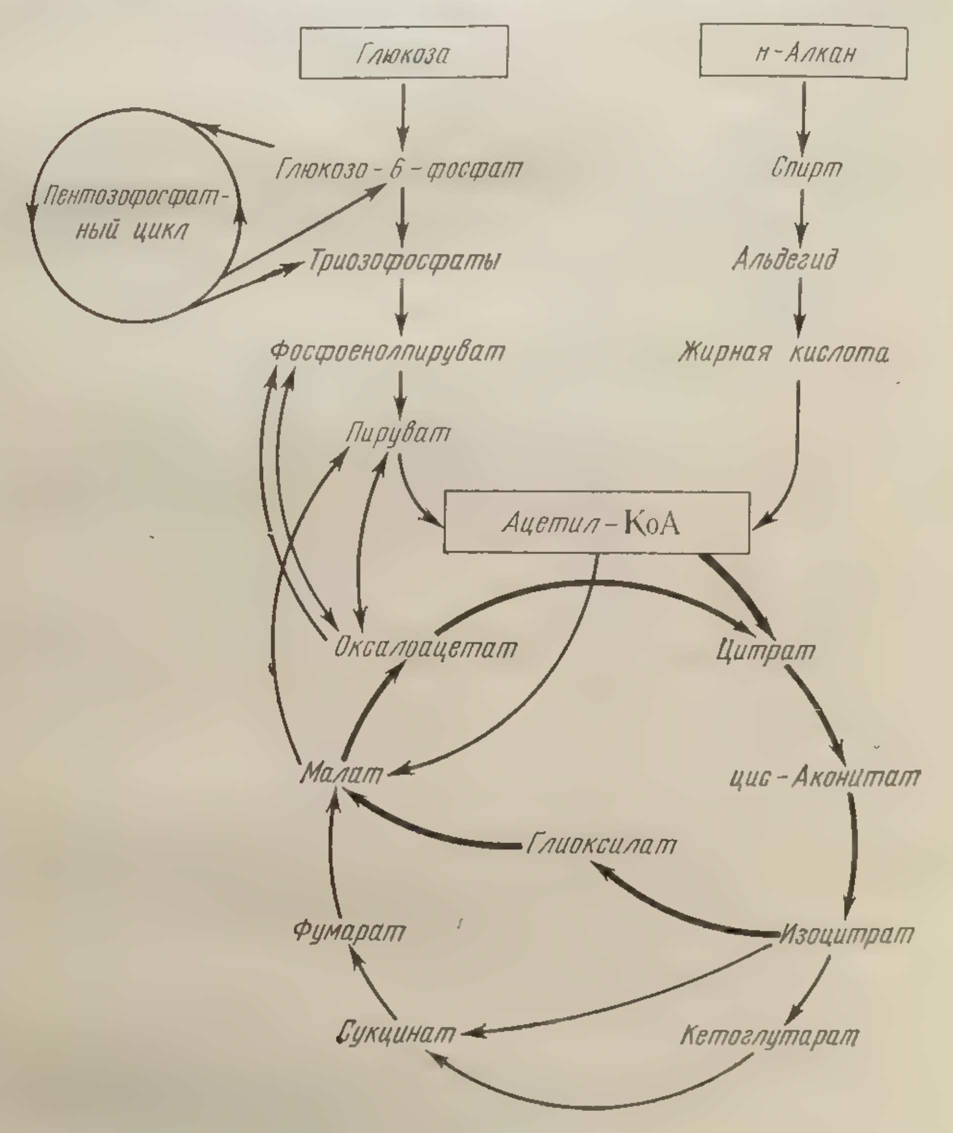
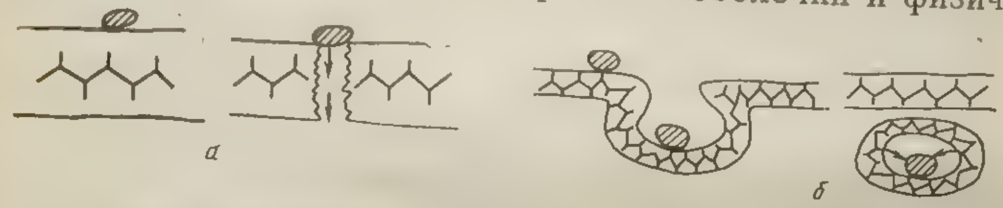


Рис. 72. Пути окисления *н*-алканов дрожжами.

ходятся внутри клетки, то доступность углеводородного субстрата действию этих ферментов во многом зависит от проницаемости клеточной оболочки. Наблюдения за клетками, развивающимися на углеводородах, в фазово-контрастный и люминесцентный микроскоп, а также исследование ультратонких срезов в электронном микро-

скопе позволили установить, что проникновение углеводородов в клетку происходит при непосредственном контакте и осуществляется как через имеющиеся в оболочках «поры», так и путем растворения в липопротеидных структурах оболочек. На первом этапе углеводороды проникают в клетку пассивно благодаря процессам молекулярной сорбции на поверхности оболочки и физиче-



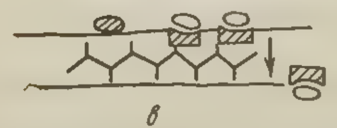


Рис. 73. Пути поступления углеводородов через цитоплазматическую мембрану.

ской диффузии и аккумулируются в оболочках, растворяясь в их липидной части. Непосредственное участие липопротеидного комплекса оболочки в переносе углеводородов в клетку в последние годы получило определенные экспериментальные подтверждения.

При выращивании дрожжей Candida intermedia и Torulopsis famata на средах с парафином в них накапливается больше полифосфатов, чем при выращивании на средах с глюкозой. Причем полифосфаты этих видов дрожжей представлены в основном кислотонерастворимыми полифосфатами, несущими большой запас энергии.

Следующим после оболочки и главным барьером на пути проникновения углеводородов в клетку является цитоплазматическая мембрана ЦПМ, которая избирательно пропускает внутрь клетки только те вещества, которые ей необходимы для жизнедеятельности.

Возможны 3 пути поступления углеводородов через ЦПМ (рис. 73):

1) в ЦПМ имеются устьица-проходы (рис. 73, *а*), через которые проникают глобулы парафина (гипотеза сомнительна [1]);

2) происходит выпячивание ЦПМ (рис. 73, *б*), она обволакивает глобулу, замыкается, и парафин под действием ферментов переваривается (гипотеза сомнительна [1]);

---

[1] Сомнения против обеих гипотез заключаются в том, что вряд ли мембрана сможет быстро восстановиться.

3) ферментативным путем — в месте подхода субстрата образуются или активируются ферменты, они захватывают субстрат и переносят его внутрь клетки, а затем разгружаются (рис. 73, *в*). Эти ферменты относятся к пермеазам.

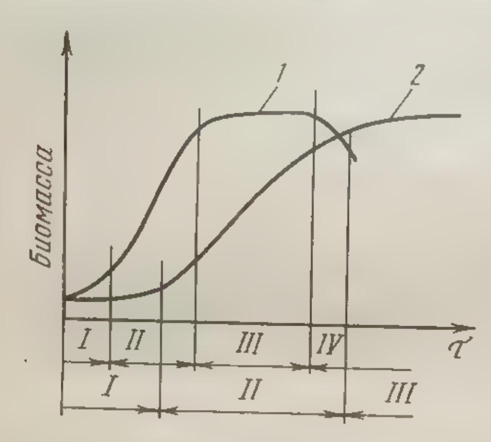


Рис. 74. Накопление биомассы дрожжей на углеводных (*1*) и углеводородных (*2*) средах.

Перевод микроорганизма на углеводородное питание связан с изменением большинства обменных процессов и перестройкой ферментных систем клетки. Совокупность специфических изменений, происходящих под воздействием новой среды, характеризует период адаптации микроорганизма к углеводородам.

Закономерности роста микроорганизмов в искусственных средах изображаются традиционными S-образными кривыми (рис. 74). На этих кривых I фаза характеризуется длительностью приспособления микроорганизма к данному субстрату; II фаза определяет преимущественное развитие микроорганизма (на стадии логарифмического роста скорость деления клеток равна скорости потребления питательных веществ); III фаза характеризуется равновесием между скоростью отмирания и образования новых клеток; на IV фазе скорость гибели микроорганизмов превышает скорость их образования.

При культивировании микроорганизмов на углеводных средах процесс адаптации почти отсутствует, лаг-фаза очень мала (см. рис. 74). При переходе на углеводородное питание стадия лаг-фазы резко удлиняется за счет адаптации микроорганизма к новому источнику питания.

Сокращения лаг-фазы можно достигнуть путем последовательного пересева микроорганизма на данном субстрате.

Адаптация микроорганизма к углеводородному субстрату может быть ускорена введением в питательную среду монокарбоновых жирных кислот, являющихся промежуточными продуктами окисления *н*-парафинов. Муравьиная и дикарбоновая кислоты не дают эффекта ускорения адаптации. Присутствие в средах с углеводородами глюкозы или другого углевода удлиняет период адаптации.

Технологические схемы получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на жидких углеводородах

Технологический процесс получения дрожжевых масс на жидких углеводородах принципиально не отличается от технологии кормовых дрожжей на гидролизатах и сульфитных щелоках. Подготовка сырья в этом случае занимает минимальное место в технологической схеме по сравнению с получением кормовых дрожжей на гидролизатах и щелоках. Различия заключаются лишь в объемах производства (мощность предприятия по производству белковых препаратов на жидких углеводородах в несколько раз больше, чем предприятий по производству кормовых дрожжей на гидролизатах и сульфитных щелоках).

При эксплуатации предприятий большой мощности часто возникают трудности в подвозе сырья, в обезвреживании сточных вод, в очистке выбрасываемого в атмосферу воздуха и т. д. Самым энергоемким процессом в технологии кормовых дрожжей является выращивание микроорганизмов, особенно большие энергетические затраты имеют место при культивировании дрожжей на углеводородах нефти, связанные с большей потребностью микроорганизмов в кислороде. На этой же стадии производства значительны затраты сырья, химикатов, вспомогательных материалов (составляют более $1/3$ всех затрат в себестоимости готового продукта). Поэтому рационально выбранный режим культивирования, совершенная аппаратура и продуктивный штамм во многом определяют рентабельность данного производства.

Основными показателями процесса выращивания являются: концентрация микроорганизмов в культуральной жидкости, содержание в биомассе примесей, включая и остаточные углеводороды, физиологическое состояние микробных клеток и себестоимость 1 т биомассы. Поэтому от проведения процесса выращивания во многом зависят и последующие технологические операции, связанные с получением товарного продукта.

Принципиальная технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на очищенных жидких *н*-парафинах нефти. Схема (рис. 75) включает следующие основные операции: подготовку питательной среды, выращивание и дозревание биомассы микроорганизма, отделение и промывку полученной биомассы от культуральной жидкости, концентрирование биомассы и ее сушку.

Предварительно очищенные жидкие парафины поступают в резервуар *1*, откуда дозируются в ферментатор *2* для выращивания дрожжей. Одновременно в ферментатор задаются посевной материал (в начальный момент культивирования), раствор минеральных питательных солей, состоящий из водной вытяжки супер-

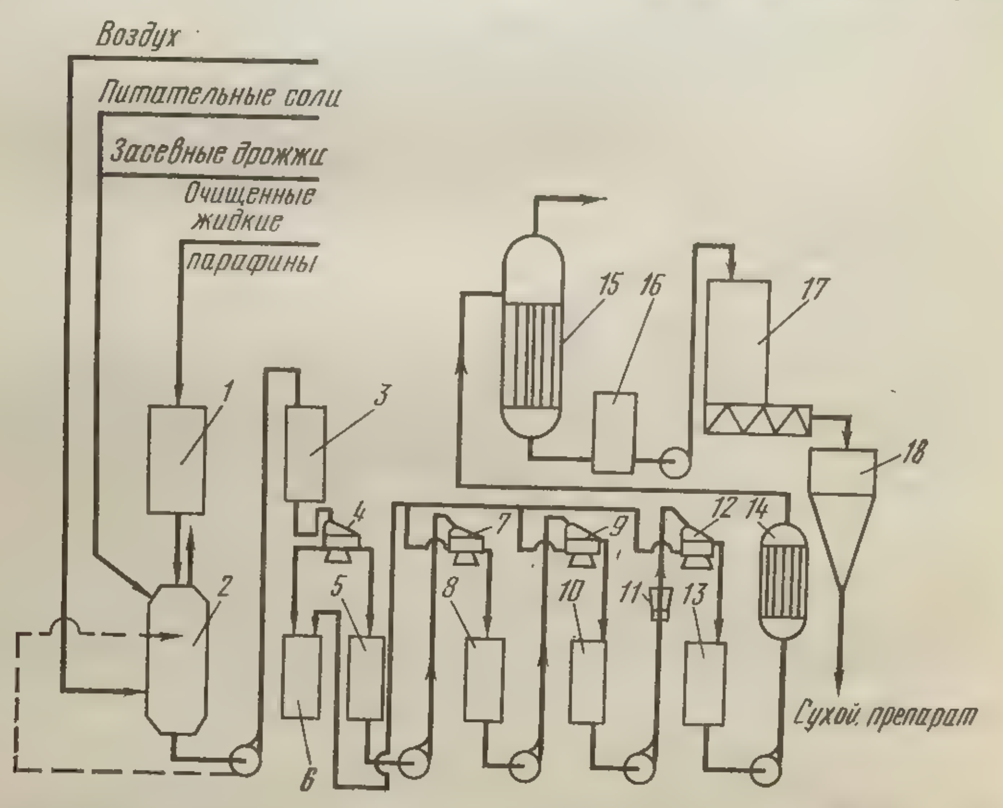


Рис. 75. Принципиальная технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на очищенных *н*-парафинах:

1 — промежуточный резервуар; *2* — ферментатор; *3* — декантатор; *4, 7, 9* и *12* — сепараторы I, II, III и IV ступеней; *5, 8, 10, 13* — сборники дрожжевой суспензии после сепараторов I, II, III и IV ступеней; *6* — сборник отработанной культуральной жидкости и промывных вод; *11* — эжектор; *14* — теплообменник; *15* — двухкорпусная вакуум-выпарная установка; *16* — сборник дрожжевого концентрата; *17* — распылительная сушилка; *18* — бункер.

фосфата, хлористого калия, сернокислого магния, сульфата аммония, аммиачной воды, микроэлементов (в качестве растворителя на 60—80% используется отработанная культуральная жидкость) и компрессором нагнетается сжатый воздух. Процесс выращивания дрожжей непрерывный и полностью автоматизированный.

Питательная среда, применяемая для выращивания дрожжей на очищенных *н*-парафинах, состоит из пара-

финов и смеси минеральных солей: $(NH_4)_2SO_4$, суперфосфата, аммиачной воды, $MgSO_4$, $MnSO_4$, KCl, $FeSO_4$, а также ряда солей, вносимых в малых дозах как источники Zn, Cu, Co, и других элементов. Существует специальный узел для приготовления солевой добавки к питательной среде. Суперфосфат готовят растворением его в воде, подкисленной серной кислотой. Используют только раствор, в который добавляют соли, исходя из их совместимости. Раствор микроэлементов обычно готовится отдельно. Аммиачная вода подается в ферментатор как источник азота и как регулятор pH культуральной жидкости. Перед подачей раствора питательных солей в ферментатор его необходимо фильтровать для удаления шлама, который содержит гипс и другие нерастворимые осадки.

Узел приготовления посевного материала на заводе кормовых дрожжей работает постоянно. Посевной материал получают каждый раз, когда начинают производство, когда понижается продуктивность культуры, появляется инфекция, при переходе на новую производственную культуру, для поддержания уровня исходной культуры в ферментаторах и т. д.

Выращивать производственную культуру можно в ферментаторах различной конструкции. Обычно для выращивания дрожжей на парафинах используют ферментаторы большой вместимости — до 850 м³. Процесс выращивания дрожжей регулируется скоростью протока жидкости через аппарат, количеством подаваемых парафина и аммиачной воды.

В связи с тем что при переработке жидких парафинов необходимо использовать все содержащиеся в питательной среде *н*-алканы и получить дрожжи с минимально допустимым содержанием остаточных углеводородов без их дополнительной экстракции из биомассы, следует выращивать дрожжи при относительно низких концентрациях парафинов в среде. Для утилизации остаточных парафинов, аккумулированных дрожжевыми клетками, ВНИИсинтезбелок предложил новый способ выращивания дрожжей. Процесс осуществляется в двух ферментаторах в две стадии. Первоначально дрожжи выращивают на питательной среде с *н*-парафинами и всеми необходимыми добавками питательных веществ, а затем после сгущения и отмывки их помещают во второй фер-

ментатор, куда не добавляют источник углерода — дрожжи вынуждены использовать накопленные в клетках углеводороды и липиды. Эта стадия часто называется «дозреванием», или «голоданием». На этой стадии в дрожжевой биомассе резко снижается содержание остаточных углеводородов и липидов, что положительно сказывается на качестве готовой продукции.

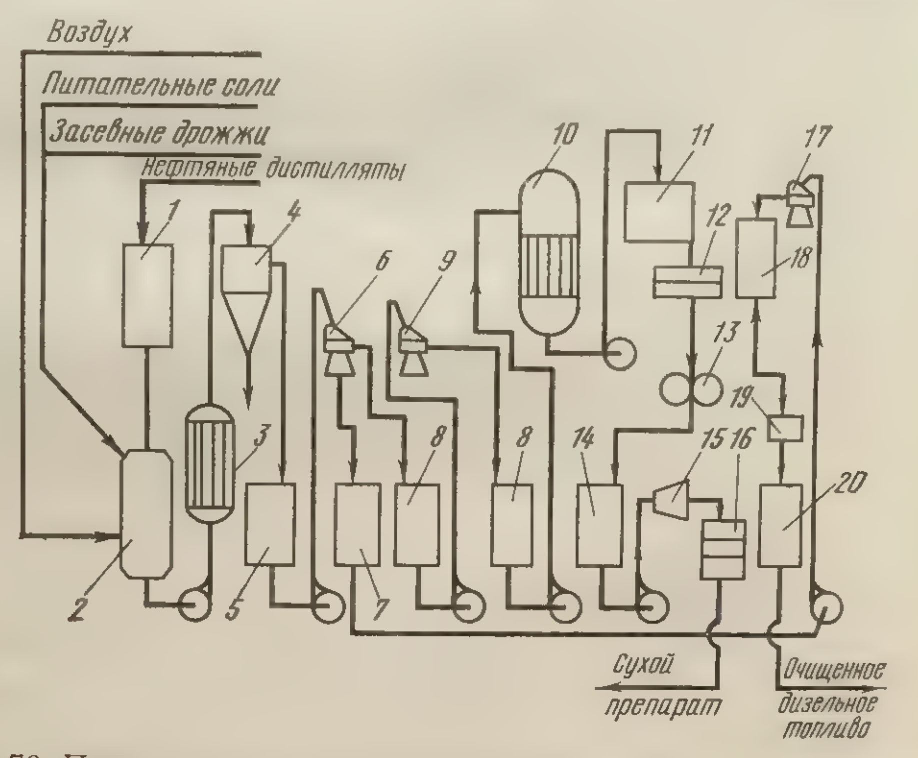
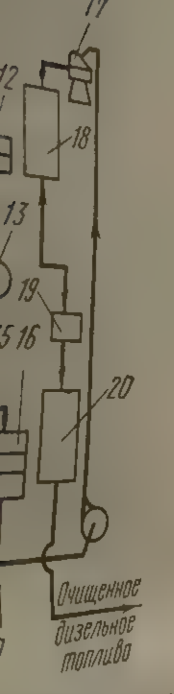


Рис. 76. Принципиальная технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на нефтяных дистиллятах:

1 — сборник; *2* — ферментатор; *3* — подогреватель; *4*, *7* — декантатор; *5*, *8* — сборники с мешалкой; *6*, *9* — сепараторы соответственно I и II ступеней; *10* — выпарная установка; *11* — сушилка; *12* — жаровня; *13* — вальцовый формователь; *14* — шайбовый экстрактор; *15* — центрифуга; *16* — сушилка-дезодоратор; *17* — сепаратор для депарафинизата; *18* — сборник; *19* — фильтр; *20* — сборник очищенного депарафинизата.

Принципиальная технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на нефтяных дистиллятах. По этой схеме (рис. 76) нефтяной дистиллят из сборника *1* дозируется в ферментатор *2*, куда одновременно подается водный раствор питательных солей, состоящий из суперфосфата, хлористого калия, сернокислого магния, сульфата аммония, аммиачной воды и микроэлементов. В ферментатор одновременно подаются посевной материал и воздух из компрессора. Готовая биомасса дрожжей не-



прерывно отбирается и подается насосом через подогреватель *3* в декантатор *4*, где она разделяется на верхний слой — дрожжевую суспензию в нефтяном дистилляте и нижний — отработанную культуральную жидкость, которая после охлаждения снова возвращается в ферментатор *2*.

Из декантатора *4* дрожжевая суспензия поступает в сборник с мешалкой *5*, где обрабатывается горячим водным раствором поверхностно-активного вещества (ПАВ), и затем направляется на сепараторы *6* I ступени. Полученный депарафинизат поступает в декантатор *7*, а дрожжевая суспензия — в сборник с мешалкой *8*, где она повторно обрабатывается водным раствором ПАВ и подается затем на сепараторы *9* II ступени. Сконцентрированная дрожжевая суспензия поступает в выпарную установку *10*, где окончательно концентрируется, и затем направляется в сушилку *11*. Дрожжи после сушки направляются в шайбовый экстрактор *14*, где они обрабатываются бензином в противотоке. Получаемая при этом жидкая фракция направляется на ректификацию для разделения на биожир и растворитель.

Экстрактивная обработка биомассы растворителями, которая обычно осуществляется проточным методом в экстракторах, применяемых при выделении растительных масел из семян, необходима для получения дрожжевой биомассы требуемого качества по содержанию остаточных углеводородов (не более 0,1%) и липидов (не более 5%), так как нефтяные дистилляты содержат трудноусваиваемые тяжелые *н*-алканы с числом углеродных атомов более 18.

Получаемый при экстракции дрожжей биожир состоит на 90% из истинного жира (ацилглицерины, фосфоглицериды, свободные жирные кислоты) и на 10% — из неомыляемых веществ (большей частью углеводородов).

Рафинированный дрожжевой шрот поступает на центрифугу *15*, откуда после отделения растворителя транспортируется в сушилку-дезодоратор *16*. Здесь он окончательно отделяется от растворителя и в виде готового дрожжевого концентрата отправляется на склад готовой продукции.

При микробиологической депарафинизации нефтяных дистиллятов выделяется нефтяной «депарафинизат», содержащий некоторое количество продуктов метаболизма. Для их удаления депарафинизат подвергается щелочной очистке, а затем смешивается в определенной пропорции с головной фракцией для получения стандартных дизельных топлив или масел.

Особенности процесса выращивания микроорганизмов на жидких углеводородах нефти

Потребление субстрата и рост биомассы

Скорость и полнота потребления микроорганизмами углеводородов в качестве единственного источника углерода прежде всего обусловлены степенью гетерогенности субстрата и наличием в данном случае четырехфазной системы (газ — вода — жидкий углеводород — твердое вещество).

Исследования распределения клеток в жидких фазах (углеводород — вода) показали, что 1/3 микробных клеток растут в водной фазе, а 2/3 адсорбируются на поверхности парафиновых капель. При этом клетки, атакующие капли парафина диаметром менее 3 мкм, растут в водной среде или потребляют растворенные парафины из водной среды. Капли парафина диаметром более 3 мкм адсорбируют на своей поверхности клетки микроорганизмов. Фракция клеток, атакующих капли парафина диаметром 5 мкм и более (адсорбирующихся на них), очень мала. Такое соотношение (равновесие) между явлениями адсорбции и десорбции остается постоянным в процессе культивирования микроорганизмов.

Капли углеводородов размером менее 3 мкм усваиваются микроорганизмами, проникая внутрь клетки через имеющиеся в клеточной стенке гидрофобные отверстия. Капли диаметром более 3 мкм, адсорбируя на своей поверхности клетки микроорганизмов, образуют биологические флокулы — агрегаты.

Образование флокул вызывается присутствием липофильных материалов на клеточных стенках углеводородассимилирующих микроорганизмов. В частности, у дрожжей Candida tropicalis адсорбция и удерживание капель углеводородов на поверхности клеток происходят за счет комплекса маннан — жирная кислота.

В непосредственной близости от клетки под действием внутриклеточных веществ большие капли углеводорода распадаются (растворяются) до небольших по размеру капель (псевдорастворимость), способных проникать внутрь клеток. С увеличением концентрации клеток псевдорастворимость и, следовательно, растворимость углеводородов повышаются (рис. 77). Максимальное увеличение псевдорастворимости соответствует ли-

нейной фазе роста микроорганизма. При этом изменение величины псевдорастворимости не оказывает влияния на скорость роста микроорганизма в водной фазе.

Количество клеток обеих фракций (растущих в водной фазе и адсорбированных на поверхности капель парафина) удваивается с одной и той же скоростью.

Механизм внутриклеточного переноса углеводородов полностью не выяснен. Однако известно, что углеводороды аккумулируются в микротелах или липидных включениях клеток, где локализованы ферменты, катализирующие окисление алканов до органических кислот. Поэтому содержание липидов в клетках микроорганизмов, растущих на углеводородах, значительно выше по сравнению с их содержанием в клетках микроорганизмов, растущих на глюкозе. Причем уже в момент внесения микроорганизмов в среду с углеводородами содержание в них липидов удваивается.

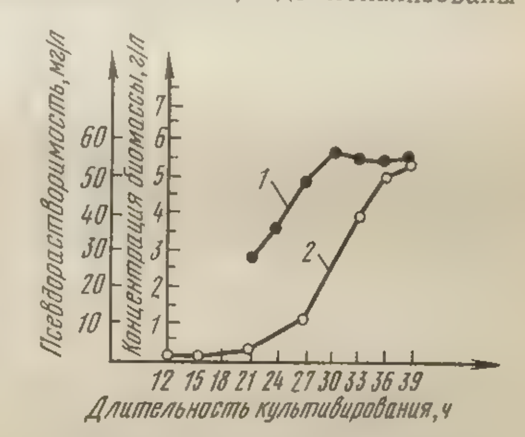


Рис. 77. Изменение растворимости (псевдорастворимости 1) и концентрации биомассы (2) при периодическом культивировании Candida lipolytica (скорость аэрации 3,92 м³/ч).

Типичный периодический процесс культивирования микроорганизмов на жидких углеводородах представлен на рис. 78. Кривая накопления биомассы может быть условно разделена на три участка. Первый описывает период, характеризующийся избытком субстрата и относительно небольшим количеством клеток. В этот период каждая последующая капля субстрата коалесцирует с флокулой после того, как предыдущая капля полностью потреблена клеткой. В этот период клетки способны расти с максимальной скоростью.

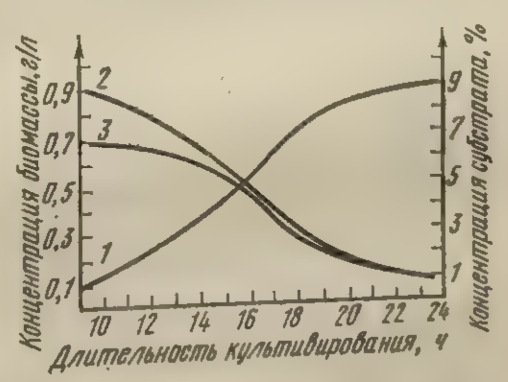


Рис. 78. Накопление биомассы и потребление субстрата в процессе периодического культивирования микроорганизмов на жидких углеводородах:

1 — концентрация биомассы; 2 — общий субстрат; 3 — субстрат, не связанный во флокулы.

Второй участок (прямая линия) характеризует период роста клеток с постоянной скоростью. В результате непрерывного роста клеток их количество на единицу флокул повышается, количество субстрата в культуральной жидкости снижается, остается меньшее количество субстратных капель. Потребление субстрата ускоряется, тогда как время между коалесценцией субстратной капли с флокулой возрастает, так как большему числу флокул соответствует меньшее количество капель субстрата. Поэтому в некоторых флокулах субстрат будет истощаться еще до того, как другая капля сможет коалесцировать с флокулой. Рост клеток в этих флокулах замедляется. Когда субстрат в культуральной жидкости будет потреблен, все флокулы испытают недостаток питания.

Эффективное регулирование процесса ферментации может быть осуществлено на линейной фазе роста (третий участок), когда перенос резервов субстрата из жидкости к растущим элементам (флокулам) лимитирует образование биомассы. Исчезновение флокул наблюдается в конце линейной фазы, когда внеклеточный материал превращается во внутриклеточный продукт в результате потери целостности флокул.

При построении моделей, описывающих процесс культивирования на углеводородах, делаются следующие приближения и предположения:

1. Клетки преимущественно содержатся во флокулах.

2. Флокула моделирована как аппарат полного смешения.

3. Рост в пределах флокулы описывается моделью Моно с кинетическими параметрами, типичными для Candida tropicalis, растущего на *н*-гексадекане ($\mu_{max}=0{,}31$ ч$^{-1}$; $K_S=0{,}1$ г/л; $Y=1{,}0$ г СБ на 1 г субстрата).

4. Введение свежего питания во флокулы осуществляется в результате коалесценции. Частота коалесценции n описывается уравнением

$$28n = 5{,}4 \cdot 10^{-5}\,\Phi \cdot 0{,}5n^{1,33},$$

где Ф — содержание фракции диспергированной фазы, %.

5. Флокулы коалесцируют с другими флокулами, с пузырьками воздуха или субстратными каплями. Тип коалесценции зависит от объема фракции, способной коалесцировать.

6. Размеры капель субстрата, включающихся во флокулы при коалесценции, определяются их средним диаметром (в см)

$$d_{ср} = 0,193 D_м \, We^{-6},$$

где 0,193 — переводной коэффициент;
$D_м$ — диаметр мешалки, м;
We — число Вебера.

7. Стабильные размеры флокул находятся в зависимости от уровня турбулентности. Максимальный стабильный D_{max} и минимальный нестабильный D_{min} размеры рассчитываются по уравнениям:

$$D_{max} = \begin{cases} 0,44 D_м \, We^{-6} & \text{при } n \geqslant 1400 \text{ об/мин}, \\ 0,27 D_м \, We^{-6} & \text{при } n < 1400 \text{ об/мин}, \end{cases}$$

$$D_{min} = 0,1 D_{max}.$$

Флокулы, размеры которых превышают стабильные размеры, делятся на две меньшие флокулы равной концентрации.

Удельная скорость роста микроорганизмов, ассимилирующих углеводороды, может быть представлена в виде следующей математической модели:

$$\mu = \mu_{max} S / [K_S + S + K_r (S_0 - S) + K_{pr} S (S_0 - S)].$$

Таблица 27

Штамм дрожжей	μ_{max}, ч$^{-1}$	Значения коэффициентов для дрожжей Candida guilliermondii			
		K_S, г/л	K_r	K_{pr}, л/г	α_S, г/г СБ
Н-529	0,52	0,10	0,025	0,035	0,83
Н-704	0,55	0,10	0,050	0,027	0,81
Н-744	0,98	0,09	0,034	0,065	0,78
Н-542	0,70	0,07	0,075	0,045	0,88
Н-640	0,64	0,08	0,062	0,073	0,80
Н-569	0,80	0,15	0,010	0,117	0,82
Н-638	0,62	0,11	0,027	0,019	0,80
Н-735	0,80	0,55	0,024	0,051	0,70

Концентрацию субстрата можно рассчитать по уравнению

$$S=\frac{1}{2}\left(S_0-\frac{\mu_{max}}{D}\cdot\frac{1}{K_{pr}}+\frac{1}{K_{pr}}-\frac{K_r}{K_{pr}}\right)+$$

$$+\sqrt{\frac{1}{4}\left(S_0-\frac{\mu_{max}}{D}\,\frac{1}{K_{pr}}+\frac{1}{K_{pr}}-\frac{K_r}{K_{pr}}\right)^2+S_0\frac{K_r}{K_{pr}}+\frac{K_s}{K_{pr}}}.$$

Концентрация биомассы x равна $(S_0-S)/\alpha_S$ (где α_S — коэффициент пропорциональности, равный количеству субстрата, расходуемого на единицу вновь образующейся биомассы).

В табл. 27 приведены значения коэффициентов для некоторых штаммов дрожжей Candida guilliermondii.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на жидких углеводородах нефти

Состав питательной среды. Для развития микроорганизмов на средах с жидкими углеводородами (парафинами) необходимо наличие в среде источников азота, фосфора и микроэлементов, а также витаминов.

В качестве источника азота при культивировании на парафинах используются различные органические и неорганические азотсодержащие вещества: гидролизаты белка, дрожжевой экстракт, аминокислоты, аспарагин, мочевина, аммиак, аммонийные соли (цитраты, сульфаты, фосфаты и др.). На средах с окисленными формами азота рост углеводородассимилирующих микроорганизмов значительно слабее.

В среду вводятся также источники фосфора (суперфосфат или фосфорная кислота), калия (хлористый калий), магния (сернокислый магний).

На активность роста микроорганизмов, культивируемых на углеводородах и жирных кислотах, оказывают стимулирующее влияние микроэлементы, в частности железо, марганец и цинк. Помимо активирующего влияния на рост дрожжей отмечено влияние данных микроэлементов на качество получаемой биомассы. При выращивании микроорганизмов на средах с недостаточным содержанием марганца, железа и цинка содержание углеводов в дрожжах снижается с 5,78 до 1,5%, одновременно содержание белков повышается с 41 до 50%.

Замечено положительное влияние ионов калия и рубидия на процесс окисления тетра- и гексадекана культурой Corynebact sp.

Потребность дрожжей в витаминах, в частности в биотине, изменяется в зависимости от длины углеродной цепи используемого *н*-алкана: на алканах с числом углеродных атомов 10—11 и 12 рост дрожжей без биотина невозможен, на алканах с C_{13} — C_{17} наблюдается незначительный рост в отсутствие биотина, при его внесении скорость роста повышается в 1,5—2 раза; скорость роста дрожжей на C_{18} и C_{19} достаточно высокая, внесение биотина практически не оказывает влияния на нее. Некоторая потребность микроорганизмов в биотине при росте на *н*-алканах C_{17} — C_{20} сохраняется на ранних стадиях развития.

Различная потребность в биотине дрожжей может быть связана с неодинаковым механизмом их окисления. Не исключена возможность снижения потребности в биотине за счет образующихся в процессе первичного окисления углеводородов высших жирных кислот, в обычном синтезе которых из ацетата участвует биотин. В частности, мутант Rhodotorula glutinis, неспособный расти без добавок никотиновой кислоты на углеродных средах, на средах с *н*-алканами без биотина дает обильную биомассу.

Потребность дрожжей в тиамине при их росте на средах с *н*-алканами в 2—5 раз ниже потребности тех же культур на среде с глюкозой. Отчетливый рост тиаминдефицитных дрожжей на средах с *н*-алканами возможен при более низких концентрациях тиамина $C_т$, чем на среде с глюкозой (рис. 79). Содержание тиамина в клетках как тиаминавтотрофных (C. tropicalis), так и тиамингетеротрофных дрожжей (C. lipolytica) значительно ниже (в 2—5 раз) при их росте на среде с гексадеканом. Уменьшение потребностей в тиамине при росте на средах с *н*-алканами связано с уменьшением активности тиаминсодержащего фермента пируватдегидрогеназы.

В условиях дефицита тиамина при выращивании тиамингетеротрофных дрожжей (C. lipolytica) наблюдается лимитирование роста и выделение в среду кетокислот, при росте на среде с *н*-парафинами — γ-кетоглутаровой, на среде с глюкозой — пировиноградной кислоты (рис. 80).

Четких данных о том, в каких именно витаминах и в каких количествах нуждаются дрожжи при росте на углеводородных средах,

нет. Обычно при выращивании дрожжей на *н*-алканах в среду вводят универсальные источники витаминов типа дрожжевого автолизата.

Некоторые виды дрожжей Candida можно выращивать на углеводородных средах без добавления какихлибо факторов роста. Например, без витаминов успешно растут смешанные культуры Candida intermedia (штамм, нуждающийся в биотине) и C. lipolytica (штамм, нуждающийся в тиамине) с взаимным снабжением витаминами, а также культуры, обладающие выраженной потребностью в биотине или тиамине при выращивании на глюкозе, например C. tropicalis, C. guilliermondii, C. lipolytica.

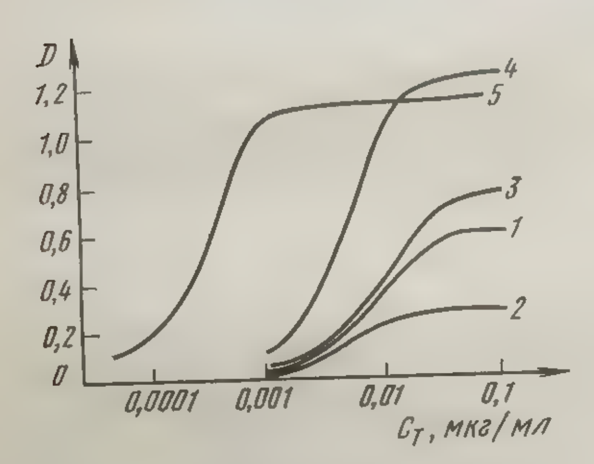


Рис. 79. Накопление биомассы некоторых дрожжевых культур (*1* — Pichia fermentans; *2* — Endomyces magmesii У-1079; *3* — Debaryomyces disporus Д-2Д; *4*, *5* — Candida lipolytica 695) в зависимости от количества тиамина $C_т$, внесенного в питательную среду:

1—4 — среда с глюкозой; *5* — среда с гексадеканом.

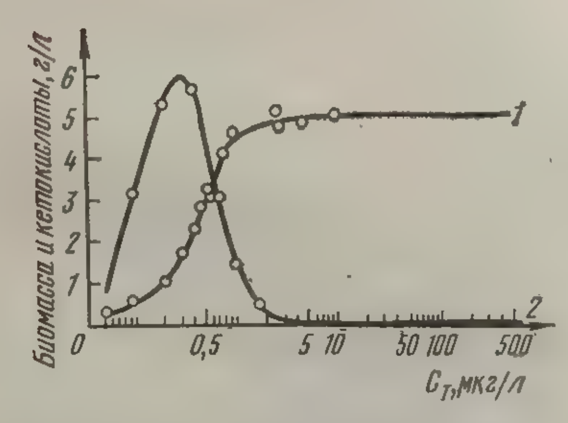


Рис. 80. Накопление биомассы C. lipolytica 695 (*1*) и образование кетокислот (*2*) в зависимости от количественного содержания тиамина в среде с гексадеканом.

Белковые препараты, полученные выращиванием микроорганизмов на углеводородном сырье, в частности на очищенных *н*-парафинах, имеют следующий состав (в %): вода — 6—10; сырой белок (N×6,25) — 50—60 и выше; жир — до 5; углеводы — 10—22, зола — 10.

В белковых препаратах содержатся следующие аминокислоты (в г на 100 г белка): триптофан 1,0—3,0; лизин 5,0—8,0; метионин 0,5—1,5; аргинин 4,6—5,7; гистидин 1,6—2,1; треонин 3,3—6,7; валин 4,6—5,6; изо-

лейцин 3,4—4,8; лейцин 5,2—8,5; фенилаланин 2,5—5,0; цистин 1,8.

Условия культивирования. На процесс развития микроорганизмов большое влияние оказывают условия их культивирования: скорость перемешивания, концентрация поверхностно-активных веществ, аэрация и pH среды, температура и т. д.

Скорости потребления углеводородов и роста микроорганизмов зависят от величины поверхности контакта клеток микроорганизмов и капель субстрата. Величина поверхности контакта в свою очередь зависит от скорости перемешивания и величины поверхностного натяжения.

Увеличение скорости потребления субстрата и сокращение продолжительности роста может быть достигнуто интенсивным перемешиванием. В табл. 28 справедливость такого утверждения показана на примере периодического культивирования дрожжей Candida.

Таблица 28

Скорость перемешивания, $мин^{-1}$	Продолжительность лаг-фазы, ч	Продолжительность линейной фазы, ч	Скорость перемешивания, $мин^{-1}$	Продолжительность лаг-фазы, ч	Продолжительность линейной фазы, ч
2500	4,0	1,05	1000	6,3	2,8
2000	4,0	1,25	500	12,2	3,6

С увеличением скорости перемешивания повышается степень эмульгирования и соответственно уменьшается размер капель углеводородов. Перемешивание должно быть организовано таким образом, чтобы постоянно в среде содержалась необходимая концентрация капель парафина с размером менее 5 мкм. Степень эмульгирования характеризуется показателем среднего диаметра капель $d_{ср}$. В процессе культивирования с потреблением фракции парафинов величина среднего диаметра соответственно снижается (рис. 81).

Другим фактором, оказывающим влияние на величину поверхности контакта клеток микроорганизма и капель субстрата, является поверхностное натяжение. Введение поверхностно-активных веществ снижает поверхностное

натяжение и повышает удельную скорость роста микроорганизмов. Кроме того, в процессе культивирования некоторые микроорганизмы сами выделяют в среду поверхностно-активные вещества: Arthrobacter sp., Brevibacterium sp., Corynebacterium sp., Ps. aeruginosa. Nocardia rhodochrous выделяют трегалозолипид; Torulopsis

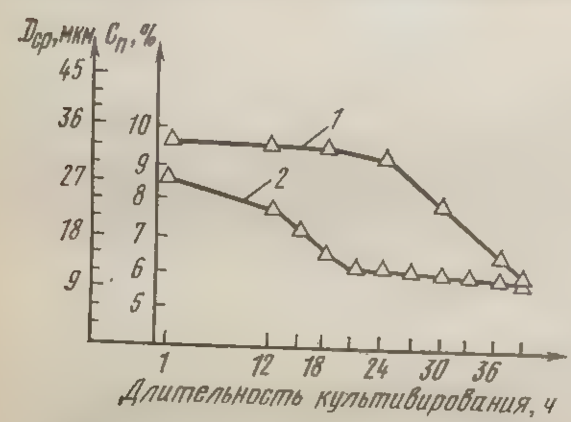


Рис. 81. Потребление фракции парафинов (1) и изменение величины среднего диаметра капель (2) в процессе периодического выращивания C. lipolytica при скорости аэрации 3,92 м³/ч.

magnoliae — рамнозолипид; Torulopsis gropenqiesseri — сафорозолипид; C. petrophilum — пептидолипид; C. lipolytica — жирные кислоты.

В процессе культивирования микроорганизмов через определенные интервалы происходит вспенивание жидкой фазы. Стадия вспенивания сопутствует образованию флокул и аккумуляции парафинов в клетках, т. е. оно происходит в момент минимального содержания в среде ПАВ. Количество поверхностно-активных веществ, выделяемых клеткой, в большинстве случаев значительно ниже того, при котором поверхностное натяжение снижается настолько, что не наблюдается вспенивания. В этих случаях необходимо внесение дополнительных поверхностно-активных веществ.

На скорости роста углеводородассимилирующих микроорганизмов и потребления субстрата влияет также величина незанятой, доступной поверхности субстрата.

На рис. 82 показано изменение величины внутренней поверхности парафинов S в процессе культивирования. Важно отметить, что максимальный рост наблюдается в случае, когда величина внутренней поверхности снижается по сравнению с максимальной величиной.

Величина внутренней поверхности S (в см²/см³) может быть рассчитана по уравнению

$$S = 6\Phi/d_{ср}.$$

На рис. 83 приведены величины свободной внутренней поверхности S_c, доступной для микроорганизмов. Эта поверхность равна общей поверхности парафинов минус площадь, уже занятая дрожжевыми клетками.

На эффективность культивирования микроорганизмов на жидких углеводородах большое влияние оказывает аэрация среды. В отличие от углеводных субстратов углеводородные могут использоваться дрожжами только в аэробных условиях. Так, при введении кислорода в среду, содержащую парафины, активность дыхания C. lipolytica значительно повышается по сравнению с выращиванием культуры на других источниках углерода, так как на окисление парафина требуется в 2,6 раза больше кислорода, чем на окисление глюкозы. В процессе культивирования микроорганизмов при аэрации среды изменяются коэффициент дыхания и удельная скорость потребления кислорода (рис. 84).

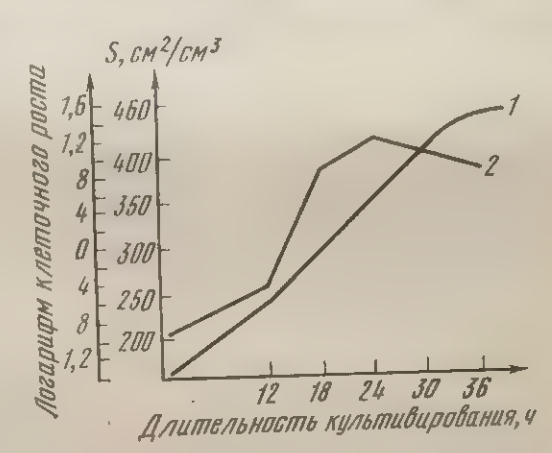


Рис. 82. Изменение величин логарифма клеточного роста (*1*) и внутренней поверхности *S* (*2*) в процессе периодического культивирования микроорганизмов на *н*-гексадекане.

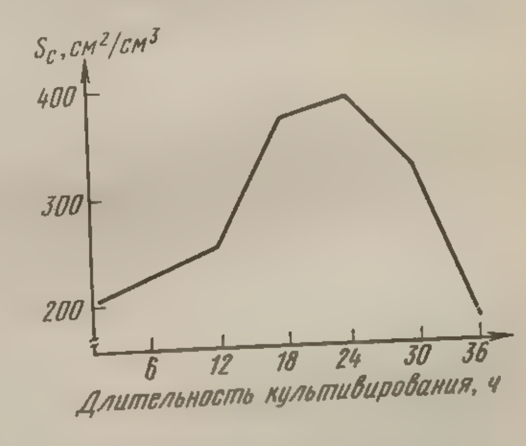


Рис. 83. Влияние длительности культивирования на величину свободной внутренней поверхности парафина S_c при периодическом культивировании Candida lipolytica на *н*-гексадекане.

Большое влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывает pH среды. Обычно для культивирования применяются среды с pH от 3,5 до 5,5. Поскольку в качестве промежуточного продукта окисления *н*-алканов выступают в основном жирные кисло-

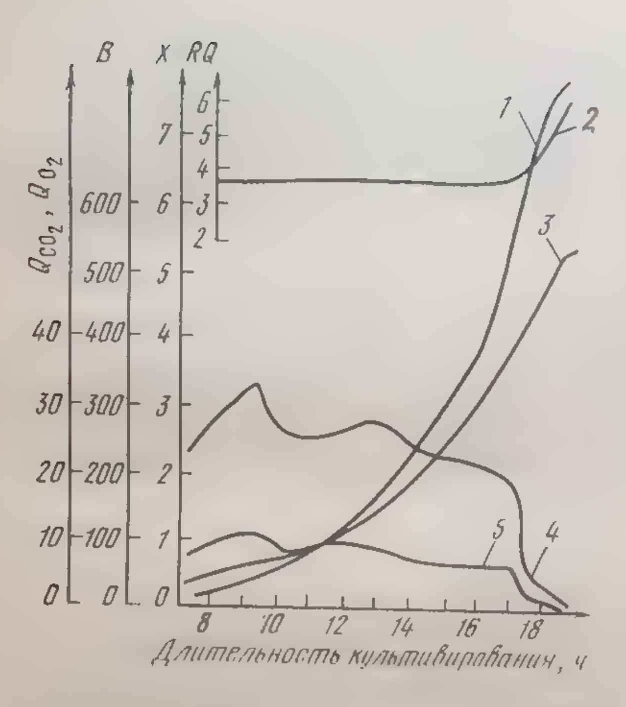


Рис. 84. Изменение концентрации биомассы x (*1*), коэффициента дыхания RQ (*2*), расхода основания для поддержания pH B (*3*), удельной скорости потребления кислорода Q_{O_2} (*4*) и удельной скорости выделения углекислоты Q_{CO_2} (*5*) при периодическом культивировании C. lipolytica на гексадекане при скорости перемешивания 2000 об/мин.

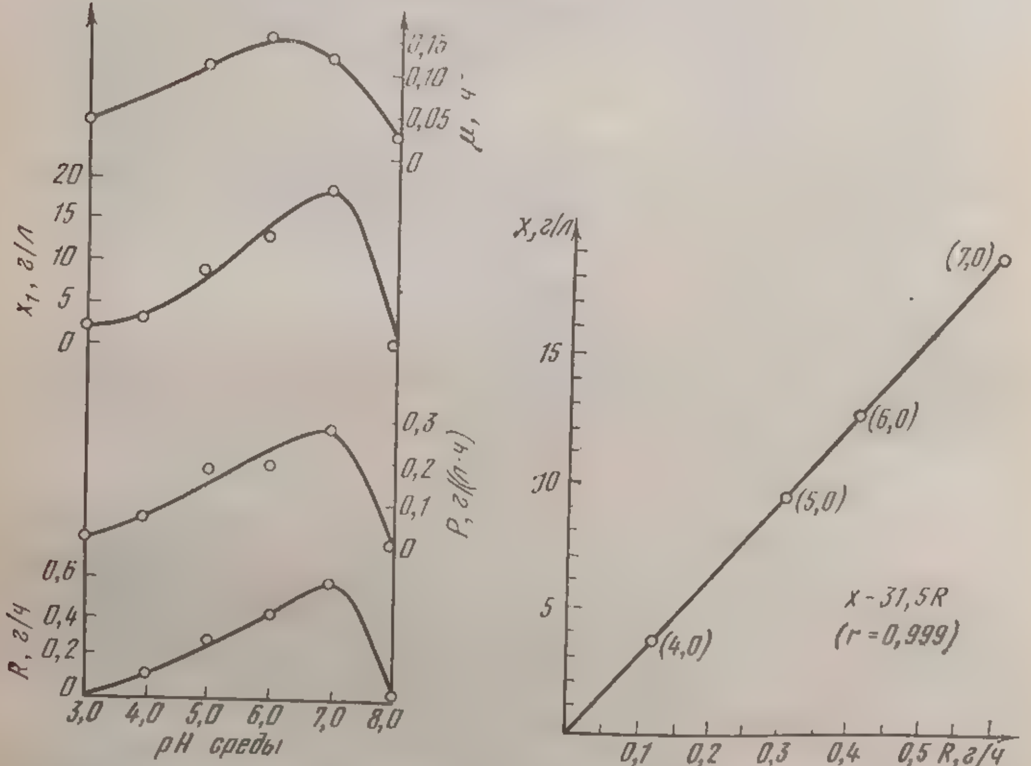


Рис. 85. Влияние pH водной среды на удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ), конечную концентрацию клеток (x_1), продуктивность (P) и среднюю скорость добавления NaOH (R) для поддержания pH.

Рис. 86. Зависимость между конечной концентрацией клеток x и средней скоростью внесения NaOH R для поддержания pH (в скобках даны значения pH, r — коэффициент корреляции).

ты, pH минеральной водной среды в процессе роста прогрессивно снижается. Если в этот процесс не вмешиваться, рост быстро прекращается, т. е. наступает стационарная фаза развития. Для стимулирования роста дрожжей в углеводородной среде величина pH постоянно поддерживается на определенном уровне, оптимальном для культивируемого продуцента.

На рис. 85 приведены зависимости влияния начальной величины pH водной среды при росте дрожжей Candida quilliermondii на среде, содержащей нефтяные дистилляты, на основные показатели процесса культивирования. Как видно из рисунка, максимальная удельная скорость роста в экспоненциальной фазе μ, соответствующая максимальной концентрации биомассы x_1 и максимальной продуктивности культуры P, и максимальная скорость подачи основания для поддержания pH на постоянном уровне наблюдается при величине pH в пределах 6,5—7,0.

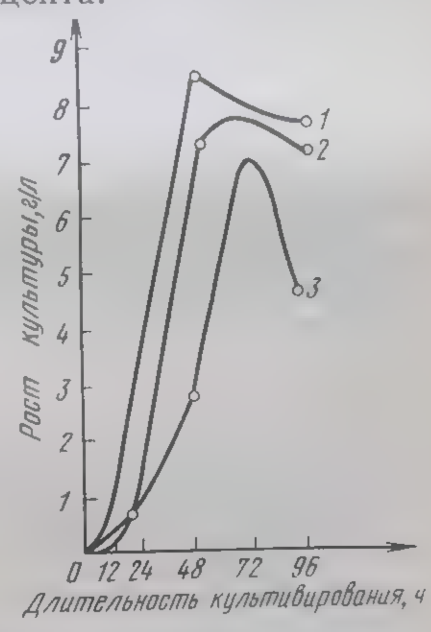


Рис. 87. Влияние температуры среды (в °С) на рост дрожжей C. intermedia H-30:
1 — 32; 2 — 28; 3 — 40.

Статистическая обработка полученных зависимостей позволила установить корреляцию между скоростью подачи основания (в данном случае NaOH) и концентрацией биомассы в среде. Полученная зависимость имеет вид прямой линии (рис. 86).

При выращивании дрожжей на углеводородах большое значение имеет температура среды. Оптимальной является температура 28—30° С. Культивирование при более низких температурах приводит к уменьшению скорости роста клеток. Изменение температуры от 28 до 40° С при выращивании дрожжей C. robusta H-331, C. intermedia H-30 оказывает существенное влияние на продуктивность культур и характер их роста (рис. 87). При температуре 40° С отсутствует стационарная фаза развития культуры: после достижения какого-то макси-

мума накопления биомассы происходит резкое отмирание клеток, что не наблюдается при выращивании дрожжей при 32—34° С.

Сравнение процессов выращивания микроорганизмов на очищенных жидких парафинах и нефтяных дистиллятах

При сравнении процессов получения микробного белка необходимо отметить следующее. Культивирование микроорганизмов на нефтяных дистиллятах, имеющих температуру кипения от 300 до 380° С, с содержанием фракции C_{15}—C_{30} от 10 до 25%, наиболее эффективно при содержании *н*-парафинов более 15%. Парафины утилизируются микроорганизмами из нефтяных дистиллятов на 60—75%, при этом потребляется около 10% нефтяных дистиллятов. Процесс культивирования на нефтяных дистиллятах аэробный, нестерильный.

Для выращивания микроорганизмов на жидких углеводородах парафин предварительно очищают до содержания C_{10}—C_{23} от 97,5 до 99%. Концентрация углеводородов в среде 1—10%. Процесс культивирования на *н*-парафинах аэробный, может быть как стерильным, так и нестерильным.

Выход кормовых дрожжей при выращивании их на нефтяных дистиллятах ниже (0,83—0,85), чем при выращивании на очищенных жидких парафинах (0,95—1,15).

Сравнительная характеристика готового продукта, полученного при выращивании дрожжей Candida lipolytica на очищенных *н*-парафинах и нефтяных дистиллятах, приведена в табл. 29.

Таблица 29

Компоненты	Содержание (в %) при выращивании на	
	н-парафинах	нефтяных дистиллятах
Сырой протеин	60—62	68—70
Лизин	5,26	6,36
Метионин	1,0	1,10
Гистидин	1,67	0,62
Всего аминокислот	54—55	60—62

§ 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГАЗООБРАЗНЫХ УГЛЕВОДОРОДАХ

Выращивание микроорганизмов на газообразных углеводородах имеет ряд преимуществ по сравнению с выращиванием их на углеводном сырье. К ним относятся: отсутствие в газообразном сырье нежелательных примесей, исключающее необходимость дополнительной очистки готовой микробной биомассы, низкая стоимость сырья и хорошая его транспортабельность.

Однако переработка газообразных углеводородов микробиологическим путем связана с определенными трудностями: низкой их растворимостью в культуральной среде, медленным ростом бактерий, сложностью конструктивного оформления процесса и повышенной потребностью микроорганизмов в кислороде.

Характеристика сырья

Источниками получения газообразных углеводородов как сырья для микробиологической переработки являются природный и попутные газы, газовый конденсат, газы нефтеперерабатывающих заводов.

Природный газ. Из газообразных углеводородов наиболее перспективным сырьем для получения белковых веществ является природный газ. Природный газ в основном состоит из метана (до 98,6%). Содержание эта-

Таблица 30

Район	Содержание в природном газе, %						
	CO_2	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	N_2
Западная Сибирь	0,02	94,3	0,07	0,03	0,01	0,03	0,2
Тюменская область	0,2	95,2	2,2	0,4	0,12	0,04	2,0
Томская область	0,06	98,6	1,3	0,5	0,3	0,08	0,3
Средняя Азия	0,6	93,4	2,1	0,6	0,2	0,05	0,3
Узбекская ССР	2,0	93,9	2,2	0,9	0,3	0,5	2,2
Туркменская ССР	0,3	93,3	3,5	0,9	0,12	0,03	0,4
Украина	0,1—0,2	92,5—98,0	0,2—1,0	0,06—0,8	0,01—0,03	0,01—0,03	1,5—1,6

на, пропана, бутана и других элементов в природном газе зависит от его месторождения (табл. 30).

Попутные газы. Добываются совместно с нефтью и представляют собой преимущественно углеводороды, растворенные в нефти. Они характеризуются повышенным содержанием гомологов метана. В среднем в попутных газах содержится (в % об.): углекислого газа — 0,1—0,2; метана — 30—35; этана — 4—20; пропана — 5—22; бутана — 5—20; пентана и более высокомолекулярных углеводородов — 1—5; азота и редких газов — 0—10; сероводорода — 0—0,01. В результате разделения сырого попутного газа на газобензиновых заводах в качестве товарной продукции получают пропановую, бутановую, пентановую фракции, стабильный газовый бензин и «сухой газ».

Газовый конденсат. Занимает по содержанию составных веществ промежуточное положение между природным и попутным газом. Он добывается из так называемых газоконденсатных месторождений с большим пластовым давлением (15—20 МПа и более). Из такого газа при снижении давления выделяется значительное количество конденсата (жидкости), содержащего высшие гомологи метана, в том числе пентан и более тяжелые углеводороды, входящие в состав бензино-керосиновой, а иногда газойлевой фракций.

Газы нефтеперерабатывающих заводов. В процессе переработки нефти часть нефтепродуктов (от 30 до 200 кг с 1 т в зависимости от условий переработки) превращается в газы. Газы нефтепереработки обычно содержат (в % об.): водорода — 6—8; метана — 30—40; этана — 9—12; этилена — 4—5 (в газах парафазного крекинга — до 23); пропана — 4—14; пропилена — 7—15; бутана — 2—8; бутилена — 8—10 и др.

Таким образом, метан является основным компонентом природного и рудничного газов, а также болотного газа и газа полей орошения. Образуется в больших количествах при коксовании угля, выделяется при перегонке, крекинге, пиролизе и других процессах переработки нефти.

При обычных условиях метан в химическом отношении инертен (инертность объясняется прочной химической связью между углеродом и водородом), при комнатной температуре реагирует лишь с хлором. При высокой

температуре в присутствии кислорода он вспыхивает и сгорает.

Компоненты природного газа, смешиваясь в определенном соотношении с воздухом, дают взрывоопасные смеси. Предел взрываемости в смеси с воздухом (в %): метана — 5—15, этана — 3,2—12,5; пропана — 2,1—9,5; *н*-бутана — 1,5—8,5.

Микроорганизмы — продуценты белка

Способность микроорганизмов использовать газообразные углеводороды была обнаружена еще в 1905 г. Микроорганизмы, окисляющие газообразные углеводороды (главным образом метан), найдены в болотистых, огородных и других почвах, в речном, озерном и морских илах, в илах городских очистных сооружений, в воде речных водохранилищ, в воде озер, морей, на листьях водяных растений, в шахтных водах, в воздухе и осадочных отложениях нефтегазоносных районов (на глубине до 300—400 м и более).

Наиболее часто способность окислять алканы от C_1 до C_4 встречается у микроорганизмов, относящихся к родам Mycobacterium и Pseudomonas. Она обнаружена также у представителей родов Bacterium, Proactinomyces, Bacillus и у некоторых организмов, принадлежащих к родам Actinomyces, Streptomyces, Flavobacterium, Chromobacterium, Corynebacterium, Acremonium, Micrococcus, Staphylococcus.

В последние годы появилась тенденция использования для биосинтеза белка на основе метана смешанных культур бактерий. Так как природный газ содержит кроме метана и другие вещества, которые не только не способствуют росту микроорганизмов, но и в некоторых случаях даже подавляют его, для микробиологического окисления природного газа выбирают микроорганизмы, способные не реагировать на присутствие примесей к метану. Чистые культуры, которые хорошо усваивают природный газ, нередко сосуществуют с бактериями, абсолютно не окисляющими метан, более того, без этих бактерий полезные микроорганизмы не усваивают газ. Смешанные популяции зачастую растут более активно, чем выделенные из них чистые культуры; смешанные

популяции устойчивы: на протяжении многих пересевов в них поддерживается постоянное соотношение видов.

Возможности работать со смешанными культурами микроорганизмов уделяется большое внимание. Это объясняется прежде всего тем, что можно создать многокомпонентную искусственную микробиологическую систему, в которой основной вид микроорганизмов (например, Ps. methanica) будет окислять газ и вырабатывать белок, а другие виды бактерий, так называемые спутники (например, M. mucosum, M. phlei, M. luteum, некоторые микроорганизмы из рода Pseudomonas), будут обогащать среду аминокислотами и витаминами, т. е. будут создаваться оптимальные условия для каждого вида микробов в используемой смешанной производственной культуре.

Не все сопутствующие микроорганизмы оказывают стимулирующее действие на рост бактерий, окисляющих метан. Так, в искусственной смеси культур с Ps. aeruginosa или Micrococcus mazei наблюдается угнетение роста других видов бактерий.

Источниками углерода для микроорганизмов, окисляющих метан и его ближайшие гомологи, могут служить как углеводороды, так и другие органические вещества. Имеются виды микроорганизмов, избирательно использующие метан и неспособные усваивать другие углеводороды (Ps. methanica, Methanomonas methanooxidans, Methylococcus capsulatis). Известен вид бактерий Bact. methanicum, который усваивает из газообразных углеводородов только метан, но в отличие от облигатных метанокисляющих бактерий этот микроорганизм может развиваться и на средах с жидкими углеводородами.

Некоторые микроорганизмы не могут развиваться за счет метана и используют *н*-алканы, начиная с этана или пропана, или их более тяжелые гомологи.

Значительно более широко в природе распространены микроорганизмы, способные усваивать всю гамму газообразных углеводородов, начиная с метана по бутан включительно. Как правило, такие микроорганизмы используют углеводороды и с более длинной углеродной цепью. Столь различное отношение микроорганизмов к углеводородам объясняется, по-видимому, экологическими условиями их обитания.

Углеводороды со средней длиной углеродной цепи (от C_5 до C_{10}) используются с большим трудом и не всеми микроорганизмами. Для некоторых микроорганизмов,

усваивающих газообразные алканы, источником углерода могут служить углеводороды иного строения. Так, например, культуры, выращиваемые на среде с пропаном, преимущественно используют предельные углеводороды с прямой цепью (~80%), 32% растут на непредельных алканах с прямой цепью и только 16% используют алканы с разветвленной цепью. Corynebacterium и Nocardia в атмосфере пропана ассимилируют 1-хлорбутан, 1-хлорпентан, 1-хлоргексан, 1-хлороктан и т. д. Микобактерии, выделенные в атмосфере газообразных углеводородов, растут на средах, содержащих продукты переработки нефти: парафине, керосине, нефтяных дистиллятах и др.

Многие микроорганизмы, окисляющие метан и другие углеводороды, могут использовать в качестве единственного источника углерода органические вещества неуглеводородного характера: углеводы, жирные кислоты, спирты и т. п. При этом спирты и жирные кислоты усваиваются хуже, чем углеводы. Из спиртов наименее доступны метанол и гексанол.

Микроорганизмы, адаптированные к окислению какого-либо углеводорода, способны использовать соответствующий спирт, альдегид и жирную кислоту. Так, например, культуры микобактерий, окисляющих метан и другие газообразные углеводороды, растут на минеральной среде в парах метилового спирта и муравьиной кислоты при их концентрации в среде не более 0,5—1%.

Многие микроорганизмы, окисляющие газообразные углеводороды, после длительного культивирования на органических средах снижают окислительную активность или полностью утрачивают способность к окислению газообразных углеводородов. При этом представители рода Pseudomonas быстрее теряют это свойство, чем организмы рода Mycobacterium. У некоторых видов Mycobacterium способность расти на средах с газообразными углеводородами сохраняется стойко.

Среди микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды, существуют и строго специфические виды (Pseudomonas methanica, Methanomonas carbonatophila, Methylococcus capsulatus, Mycobacterium paraffinicum), которые не могут расти на обычных органических средах и развиваются только за счет метана или одного из его ближайших гомологов.

Пути усвоения газообразных углеводородов микроорганизмами

Окисление газообразных углеводородов микроорганизмами может происходить по тем же схемам, что и окисление жидких углеводородов (например, окисление этана), т. е. путем атаки терминальной метильной группы алкана кислородом воздуха с образованием спирта, альдегида и жирной кислоты — продуктов с неизменным строением углеродной цепи.

Присутствие метилкетонов при окислении пропана и *н*-бутана клетками культуры Ps. methanica свидетельствует о том, что атаке может подвергаться не только первый (терминальный), но и второй атом углерода (α-окисление). Способность к образованию метилкетонов из газообразных углеводородов довольно широко распространена среди микобактерий. При образовании метилкетонов дегидрогенизации углеводорода не происходит.

Методом одновременной адаптации установлено, что метилкетоны являются промежуточными продуктами окисления пропана и бутана. При окислении метана и этана метилкетоны не обнаружены. Это и понятно, так как простейшим метилкетоном является ацетонсоединение с тремя углеродными атомами.

Вопрос о путях окисления микроорганизмами C_1-субстратов еще окончательно не решен, в особенности при потреблении ими сильно восстановленных, одноуглеродных соединений, таких, как метан и метиловый спирт. Некоторые авторы склонны считать эти микроорганизмы хемоавтотрофами, другие — гетеротрофами. Пути автотрофной и гетеротрофной ассимиляции углерода метана могут быть выражены следующим образом.

Автотрофный путь: $CH_4 + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 8\,(H)$

$$4\,(H) + CO_2 \rightarrow (CH_2O) + H_2O$$

$$4\,(H) + O_2 \rightarrow 2H_2O$$

Суммарная реакция: $CH_4 + O_2 \rightarrow (CH_2O) + H_2O$

Гетеротрофный путь: $CH_4 + (O_2$ или $H_2O) \rightarrow C$ (окисленный) + + активный H

C (окисленный) + активный $H \rightarrow (CH_2O)$*

C (окисленный) $+ H_2O \rightarrow CO_2 +$ активный H

Активный $H + O_2 \rightarrow H_2O$

Суммарная реакция: $CH_4 + O_2 \rightarrow (CH_2O) + CO_2 + H_2O$

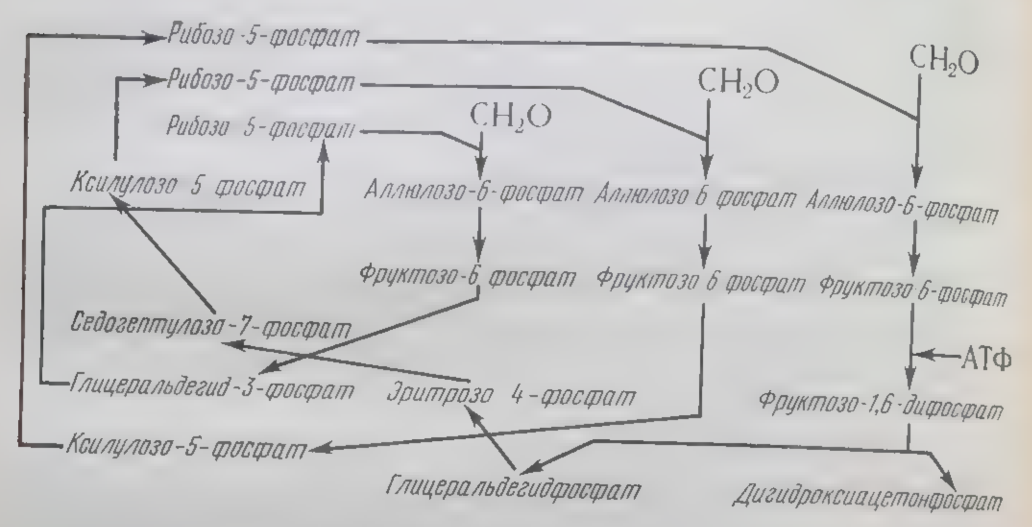
При автотрофном обмене метан должен быть разложен микроорганизмами на CO_2 и активный H и, следовательно, служить донатором водорода для синтеза клеточного материала из CO_2. При гетеротрофном пути метан окисляется частично до менее окисленного, чем CO_2, продукта, который затем включается в клетки.

Исследования по включению метана, метилового спирта и углекислого газа с мечеными атомами углерода (^{14}C) в клетки Pseudomonas methanica при росте на метане и метиловом спирте показали, что и одноуглеродные соединения, находящиеся по степени восстановленности между метиловым спиртом и муравьиной кислотой, ассимилируются разными путями. Метан и метиловый спирт быстро ассимилируются развивающимися клетками главным образом через фосфаты сахаров путем образования соединений с тремя атомами углерода, в то время как ассимиляция CO_2 связана с синтезом четырехуглеродных соединений из соединений с тремя атомами углерода.

Проведенные в последнее время исследования показали, что автотрофный метаболизм, включающий рибулозодифосфатный цикл фиксации CO_2, при окислении метана отсутствует. В пользу гетеротрофного типа питания микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды, основанного на рибулозомонофосфатном цикле фиксации формальдегида, говорит, в частности, отсутствие в бесклеточных экстрактах Pseudomonas methanica специфического фермента автотрофного обмена — карбоксидисмутазы. Включение углерода метана в состав клеток на уровне формальдегида является новым подтверждением гетеротрофного пути ассимиляции метана. Рибулозомонофосфатный цикл фиксации формальдегида включает конденсацию C_1-единиц (формальдегида) с

* (CH_2O) — условное обозначение соединений, участвующих в формировании клеточного вещества.

C_5-сахарфосфатом (рибулозо-5-фосфатом) и регенерацию C_5-акцептора молекул из гексозо- и триозофосфатов:



Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на газообразных углеводородах

Технологическая схема культивирования микроорганизмов на средах, содержащих газообразные углеводороды, существенно отличается от технологической схемы получения дрожжевой биомассы на жидких субстратах, особенно на стадии выращивания микроорганизмов.

Технологическая схема включает следующие основные операции: подготовку жидких питательных растворов, подачу в ферментатор газообразного источника углерода и кислорода, выращивание микроорганизма — продуцента белка, отделение и промывку полученной биомассы от культуральной жидкости, концентрирование биомассы и ее сушку.

Особенность выращивания микроорганизмов на природном газе состоит в том, что питательные вещества (природный газ и кислород) подаются в процесс в газообразном состоянии, и одним из основных факторов, определяющих его производительность, является массопередающая характеристика применяемой аппаратуры.

Стадия культивирования микроорганизмов выполняется в герметизированной взрывобезопасной аппаратуре

с разнообразными системами газообеспечения. Из систем газообеспечения следует выделить две основные: прямоточную без рециркуляции газовой фазы (рис. 88) и с рециркуляцией газовой фазы.

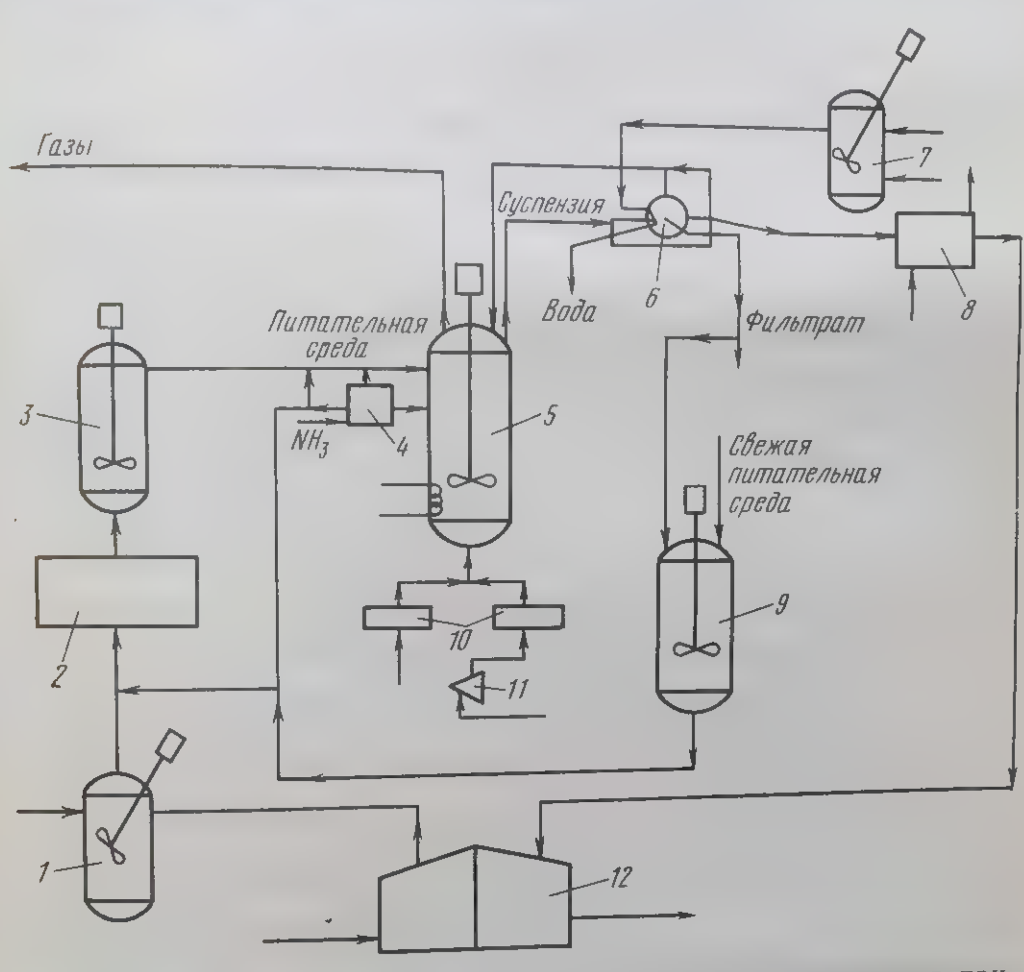


Рис. 88. Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на метане:

1 — резервуар для приготовления питательной среды; *2* — стерилизатор; *3* — резервуар для питательной среды; *4* — емкость для аммиака с клапаном; *5* — ферментатор; *6* — фильтр; *7* — резервуар с промывной водой; *8* — сушилка; *9* — смеситель; *10* — фильтр; *11* — компрессор; *12* — склад готовой продукции.

В прямоточной системе, основанной на применении газовоздушной смеси, степень утилизации метана не превышает 20—25%. В системе с рециркуляцией газовой фазы, основанной на применении кислорода вместо воздуха, степень утилизации метана и кислорода, зависящая от степени рециркуляции газовой фазы, достигает 85—90% по метану и 90—95% по кислороду. Несмотря на невысокую степень утилизации метана, прямоточная

система газообеспечения ферментатора может быть достаточно эффективной при рациональном использовании отходящих газов, например в случае использования тепла отходящих газов для внутренних нужд производства: в калориферной системе сушилки для подогрева воздуха, для подсобных производств, например для обогрева теплиц, и т. д.

Регенерированная газовая смесь и (или) свежий газообразный углеводород, кислород и инертный газ подают в ферментатор каждый через собственную систему подводящих трубопроводов. Количество подаваемых газов регулируется системой анализаторов газовой фазы на входе в ферментатор и выходе из него и определяется потребностями процесса. Одновременно в ферментатор задают раствор минеральных солей и посевной материал. Максимальная растворимость газообразного углеводорода 0,02 г/л определяется не только его низкой растворимостью, но и парциальным давлением других газов: кислорода, азота или двуокиси углерода.

Особенности процесса выращивания микроорганизмов на газообразных углеводородах

Потребление субстрата и рост биомассы

Основными компонентами газовой атмосферы, в которой выращивают газоокисляющие микроорганизмы, являются газообразный углеводород и кислород. Микроорганизмы способны развиваться в атмосфере газообразного углеводорода как при очень низких (от 0,01 до 0,0001 % об.), так и при высоких (свыше 70 % об.) его концентрациях. Однако при низких концентрациях микроорганизмы растут слабо, а при высоких концентрациях наблюдается недостаточно полное потребление углеводорода.

Оптимальная концентрация углеводорода, необходимая для построения клеточного вещества, зависит от соотношения углеводород : воздух или углеводород : кислород.

Стехиометрические соотношения в растущих культурах показали, что 80—90 % образованного формальдегида фиксируется облигатными метилотрофами в виде уг-

лерода клеток, остальное его количество окисляется до муравьиной кислоты, а затем до CO_2:

$$CH_4 \xrightarrow{+H_2O \text{ или } O_2} \begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix}\!\!>\!O \rightarrow CH_3OH \xrightarrow[-2H]{} CH_2O + H_2O \xrightarrow[-2H]{}$$

$$\nearrow \text{Фосфотриоза (80—90\%)}$$

$$\searrow HCOOH \xrightarrow[-2H]{} CO_2$$

Учитывая, что элементарный состав бактериальной биомассы, полученной из метана, практически такой же, как дрожжевой и бактериальной биомассы, выращенной на других источниках углеродного питания, эмпирическая формула биомассы может быть представлена в виде $C_{3,92}H_{6,5}O_{1,92}N_{0,5-0,7}$. На основании стехиометрических уравнений для различных культур микроорганизмов и эмпирической формулы биомассы получены показатели удельного расхода α кислорода и метана:

$$\alpha_x^{O_2} = 3,5 \pm 0,5 \text{ кг } O_2/\text{кг СБ и } \alpha_x^{CH_4} = 1,2 \pm 0,2 \text{ кг } CH_4/\text{кг СБ}.$$

Таким образом, потребность микроорганизмов в кислороде превышает потребность в метане в 2—3 раза. Однако при выборе оптимальной концентрации углеводорода в смеси необходимо учитывать, что зона взрывоопасных концентраций метана в воздухе находится в пределах 5—15%, в кислороде — 6—60%. При приближении к стехиометрическому соотношению смеси метан : воздух (1 : 7—1 : 7,5) увеличивается концентрация кислорода. Из соотношений газов метан : воздух (1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 6, 1 : 7) оптимальным является соотношение 1 : 4, соответствующее следующему содержанию газов на входе в ферментатор: CH_4 — 20%, O_2 — 16,8%. При увеличении соотношения в сторону стехиометрического, например 1 : 5, в результате потребления газов в процессе культивирования объемная концентрация метана в ферментаторе и на выходе из него будет находиться в зоне взрывоопасных концентраций (13—15%). Следовательно, процесс культивирования газоокисляющих микроорганизмов необходимо вести при составе газовой смеси, отличающемся от оптимального в сторону избытка метана, при соответствующем лимите по кислороду во избежание взрывоопасных ситуаций.

Кислород в процессе культивирования газоокисляющих микроорганизмов выступает как ингибирующий

субстрат. Зависимость $\mu = f(C)$ может быть представлена в виде

$$\mu = \mu_m \frac{C}{K_C + C + \frac{C^2}{K_y}},$$

где C — концентрация растворенного в культуральной жидкости кислорода;

μ_m, K_C, K_y — кинетические константы, имеющие для смешанной культуры следующие значения: $\mu_m = 0{,}30$; $K_C = 0{,}15$; $K_y = 20{,}00$ ($\pm 10\%$).

При концентрации растворенного кислорода меньше 0,04 г/л кислород лимитирует скорость роста микроорганизмов, а при концентрации больше 0,175 г/л наблюдается снижение удельной скорости роста культуры вследствие ингибирующего влияния растворенного кислорода. Следовательно, при работе с газовоздушными смесями рекомендуемое соотношение компонентов должно обеспечивать содержание кислорода в смеси не выше 17—18%, при более высокой концентрации кислорода наблюдается гибель бактерий. В случае применения газовой смеси углеводорода с чистым кислородом оптимум роста наблюдается при наличии в газовой атмосфере 30—40% кислорода.

Присутствие углекислого газа (от 3 до 10%) улучшает рост бактерий, использующих метан и пропан в качестве единственного источника углерода.

В табл. 31 приведены составы газовых смесей для выращивания некоторых видов метанокисляющих микроорганизмов.

Таблица 31

Вид микроорганизма	Состав газа, % об.				
	CH_4	O_2	CO_2	N_2	Воздух
Meth. methanooxidans	65	30	5	—	—
Ps. methanica	25—45	45	2—10	—	—
Ps. methanica	10—90	20	0,3	—	—
Methanomonas	40	10	5—10	40—45	—
Methanomonas methanica	33,3	—	—	—	66,7
Bacillus sp.	40	40	5	15	—
Смешанная культура	25	—	—	—	75

При выращивании смешанной культуры метанокисляющих бактерий рода Pseudomonas и Mycobacterium в ферментаторе с циркуляцией газовоздушной смеси в замкнутой системе была получена концентрация биомассы в культуральной жидкости 1,2 г СБ/л за 38 ч, выход биомассы — 0,6 г СБ на 1 л потребленного метана. В начале ферментации содержание метана и кислорода составляло соответственно 25 и 16%, введение в установку в экспоненциальной фазе роста культуры свежей метано-воздушной смеси, содержащей около 5% кислорода, продлило логарифмическую фазу роста микроорганизмов и сократило время культивирования (рис. 89). Максимальная удельная скорость роста равнялась 0,077 ч$^{-1}$, а средняя продолжительность генерации составила 9,9 ч при концентрации метана 19—22%, концентрации кислорода 9—13% и значении pH 6,7—7,1. В расчете на 1 л потребленного метана (0,715 г) было получено 0,59 г биомассы, что составляет 82,6%. Расход метана и кислорода на 1,8 г сухого вещества, полученного в опыте, составил соответственно 2,18 и 5,47 г. Молярное соотношение потребленных метана и кислорода 1 : 1,2, массовое — 1 : 2,5.

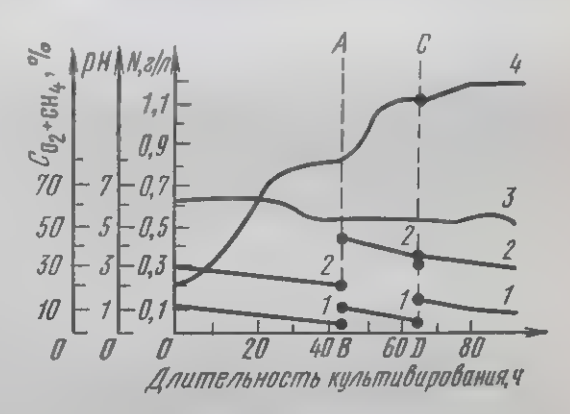


Рис. 89. Динамика роста культуры, изменения величины pH, потребления метана и кислорода при введении свежей смеси метана и воздуха (*AB* и *CD*) в фазе логарифмического роста культуры:

1 — содержание кислорода в системе (16%); *2* — содержание метана в системе (25%); *3* — величина pH; *4* — концентрация клеток N.

При использовании в качестве источников углерода гомологов метана оптимальное соотношение газов в смеси изменяется. Так, для развития этанокисляющих бактерий оптимальной является смесь, содержащая 35—40% этана, 45—50% воздуха и 10% CO_2. Пропанокисляющие бактерии Pseudomonas propanica лучше всего растут на газовой смеси, содержащей 20% пропана, 5% углекислого газа и 75% воздуха.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на газообразных углеводородах

Состав питательной среды. Для роста микроорганизмов, окисляющих газообразные углеводороды, необходимо наличие в составе питательной среды источников азота, фосфора, микроэлементов и других ростовых веществ.

Микроорганизмы, потребляющие газообразные углеводороды, могут удовлетворять свою потребность в азоте за счет самых разнообразных азотистых соединений: нитратов, солей аммония, аммиака, молекулярного азота.

Известны случаи развития бактерий в атмосфере метана и пропана на минеральной среде без азота за счет незначительной концентрации аммиака, присутствующего в окружающем воздухе. Имеются разновидности Pseudomonas methanica и бутанокисляющих микобактерий, способных усваивать атмосферный азот. Некоторые микроорганизмы одинаково хорошо развиваются на средах как с нитратным, так и с аммонийным азотом, в то время как отдельные штаммы Ps. methanica и Ps. propanica предпочитают азот нитратов. По-видимому, преимущественное усвоение тех или других форм азота зависит от физиологических особенностей микроорганизма.

Микроорганизмы, выделенные в атмосфере газообразных углеводородов, могут использовать органические источники азота: желатин, пептон, аминокислоты. Некоторые проактиномицеты и микобактерии хорошо усваивают азот мочевины; имеются сведения об использовании газоокисляющими микроорганизмами триэтиламина и пиридина.

Источником фосфора при культивировании газоокисляющих микроорганизмов могут служить различные соли фосфорной кислоты. Есть предположение, что фосфаты принимают участие в процессе окисления углеводородов и совершенно необходимы для роста бактерий. Оптимальной концентрацией фосфатов в среде является 0,1—0,5%. При культивировании на средах с пропаном и *н*-бутаном хороший рост наблюдается при концентрации 0,05%, дополнительное введение в среду фосфатов заметно стимулирует накопление культурой биомассы.

Микроэлементы, как правило, не добавляются в среды для выращивания бактерий, использующих газообразные углеводороды, так как считается, что их достаточно в водопроводной воде и солях, на которых готовится среда. Тем не менее добавки микроэлементов к среде могут оказывать как стимулирующее, так и тормозящее действие на рост бактерий. Например, развитие некоторых метанокисляющих бактерий тормозится при наличии в среде 0,01% сульфата магния, 0,002% хлористого цинка, 0,001% сульфата меди, но стимулируется присутствием 0,00025—0,3% хлористого натрия. Молибден, вольфрам, цинк и марганец в концентрации от 0,0001 до 0,00001% угнетают рост метанокисляющих бактерий, но стимулируют развитие бактерий, окисляющих пропан. Свинец в указанных концентрациях тормозит рост тех и других микроорганизмов. Медь в концентрации 0,00001% улучшает рост бактерий, окисляющих метан, и угнетает развитие бактерий, использующих пропан. Добавки кобальта (10—150 мг/л) увеличивают скорость роста спороносных бактерий рода Bacillus, потребляющих метан.

При выращивании метанокисляющих бактерий смешанные культуры этих микроорганизмов развиваются на среде с метаном лучше, чем чистые. Часто после нескольких пассажей на минеральную среду с метаном чистые культуры полностью теряют способность расти только за счет углеводорода.

Установлено, что рост метанокисляющих бактерий улучшается при внесении в среду небольшого количества вытяжки из почвы, экстракта агар-агара, дрожжевого автолизата, пиридоксина, тиамина, биотина, аскорбиновой кислоты и других аминокислот. Экстракт почвы стимулирует также рост пропанокисляющих бактерий.

Условия культивирования. Специфика культивирования микроорганизмов на газообразных углеводородах состоит в том, чтобы питательные вещества (газ и кислород), находящиеся в газообразном состоянии, переместить из пузырьков, рассеянных по всей жидкой фазе, к стенкам растущих клеток для дальнейшего переноса их в область локализации ферментов, осуществляющих метаболические реакции.

Для увеличения поверхности контакта газа с жидкостью при культивировании в стационарных условиях

на жидких и твердых минеральных средах рекомендуется вносить в питательную среду песок, окись железа, асбест, стеклянную вату, силикагель, глину и другие мелкопористые материалы.

Лучшие результаты наблюдаются при перемешивании — скорость роста бактерий повышается. Для некоторых культур газоокисляющих микроорганизмов рекомендуется не постоянное, а периодическое перемешивание.

Для обеспечения переноса необходимых количеств газообразных источников питания микроорганизмов из газовой фазы в жидкую среду необходимо создать в ферментаторе условия достаточно интенсивного массообмена, что необходимо учитывать при выборе конструкции аппарата. Одновременно ферментатор должен обеспечивать взрывобезопасные условия работы (гидрозатвор, огнепреградитель), иметь приспособления для всасывания и рециркуляции газовой смеси.

Массообмен газообразных питательных веществ при постоянной скорости газового потока и перемешивании можно увеличить путем повышения общего давления в системе или изменения соотношения газовых компонентов, а также созданием новых аэрирующих систем ферментаторов с интенсивным массообменом. Однако увеличение давления влечет за собой повышение растворимости других газов (CO_2 и N_2), а также приводит к повышению затрат на создание и обслуживание установки.

Кислород может подаваться в систему в виде атмосферного воздуха, газообразного сжатого кислорода из баллонов или их смеси, сжатого газа, богатого кислородом. Возможно применение генераторов кислорода химического, электролитического или энзиматического типа, прямого электролиза жидкой культуральной среды, каталитического или ферментативного разложения веществ, богатых кислородом, в жидких средах.

На рост биомассы оказывают влияние температура и pH среды. Принято считать, что оптимальный уровень pH для развития бактерий, окисляющих углеводороды, находится в пределах 7,0—7,2, температурный оптимум близок к 30—36° С. Однако, как показали многочисленные исследования, оптимальные пределы pH и температуры для конкретных видов микроорганизмов различаются.

Так, максимальное поглощение метана культурой Methanomonas carbonatophila наблюдается при сравнительно низком значении начального pH (около 6,5) и температуре культивирования 30—36° С. Для роста Methanomonas methanooxidans оптимальными параметрами процесса роста являются pH 6,1, температура 30° С. Pseudomonas propanica лучше всего растет при температуре 30° С на средах с начальным pH от 6,6 до 6,8. Pseudomonas methanica при выращивании на среде с нитратом натрия лучше растет в интервале pH от 6,6 до 8,0, на среде с сернокислым аммонием оптимум pH сдвигается в кислую зону.

Отдельные культуры микобактерий, усваивающих газообразные углеводороды, имеют более широкий начальный диапазон pH — от 4 до 10. Так, M.rubrum var propanicum и M. lacticolum наиболее интенсивно растут при pH 7—8,5, культура M. flavum v. methanicum при pH 9,5 растет так же хорошо, как и при pH 7.

Оптимальная температура роста микроорганизмов зависит от физиологических особенностей данного штамма и от условий его обитания. Среди микроорганизмов, окисляющих газообразные и жидкие углеводороды, встречаются термотолерантные виды, развивающиеся при температурах 32—55° С и выдерживающие кратковременный прогрев до 70—80° С.

Химический состав микробных масс, выращенных на газообразных углеводородах

Микробная биомасса, полученная из метана, представляет собой продукт, содержащий 60—65% белка, в котором есть все без исключения необходимые организму аминокислоты, а также витамины группы В. Так, бактерии рода Bacillus, выращенные на метане, содержат следующее количество витаминов (в мкг/г):

Тиамин	4,3—3,9	Холин	1890—2510
Рибофлавин	9,9—10,2	Пиридоксин	35,0—30,5
Ниацин	45,5—23,1	Кобаламин	2,0—2,6
Пантотеновая кислота	6,4—4,5	Ксантофилл	0,2—0,8

В состав этого продукта входят также углеводы, липиды, немного минеральных солей (табл. 32). И главное, в белковом концентрате, полученном из природного газа,

Таблица 32

Микроорганизмы	Содержание в 100 г сухого вещества, г				
	белка	нуклеиновых кислот	липидов	углеводов	минеральных веществ
Methylococcus methanooxidans	52,2	3,6	—	6,1	—
Methylococcus capsulatus	55,0	5,4	—	22,8	—
Bacillus sp.	32,0—36,0	—	5,2	60,0—58,0	2,8—2,4
Pseudomonas	62,0	—		58,0	—
Смешанная культура	35—65	—	3,7	25—55	2,4

не обнаружено неусваиваемых и вредных соединений. По питательной ценности белок, полученный при выращивании микроорганизмов на газообразных углеводородах, сравнивают с рыбным или соевым.

Таблица 33

Аминокислота	Метанокисляющие бактерии	Bacillus sp.	Смешанная культура	Methylococcus methanooxidans	Methylococcus capsulatus	Mycobacter rubrum
Лизин	5,87	3,15	5,3	2,61	2,23	0,82
Метионин	1,48	0,9	3,4	0,76	0,97	0,64
Фенилаланин	4,81	—	6,2	1,80	2,17	5,61
Треонин	4,64	—	4,5	2,20	2,20	1,00
Тирозин	3,86	—	4,1	1,11	1,50	—
Валин	6,64	—	8,5	2,70	2,99	0,56
Аргинин	5,79	—	5,0	2,65	2,80	2,06
Глутаминовая кислота	11,5	4,8	11,5	5,74	5,71	5,85
Глицин	6,05	—	7,7	2,90	2,63	3,29
Аспарагин	9,57	—	—	4,34	4,99	—
Пролин	4,14	—	—	2,04	1,91	—
Изолейцин	4,57	—	—	1,95	2,24	—
Лейцин	8,19	9,06	—	3,27	3,52	4,94
Гистидин	2,38	1,29	1,9	0,84	0,75	2,60
Триптофан	3,81	1,15	—	—	—	0,93
Аланин	9,18	—	—	4,39	3,42	4,21
Серин	7,61	—	—	2,02	1,99	3,36

Аминокислотный состав (в г на 100 г СВ) смешанных и чистых культур облигатных и факультативных метанокисляющих бактерий приведен в табл. 33.

Биомасса микроорганизмов, выращенных на тяжелых газообразных углеводородах, имеет следующий состав (в %):

	На бутане	На пропане
Влага	5,54	5,67
Белок	57,5	53,0
Общий азот	7,60	8,50
Общий азот в гидролизате	6,80	7,20
Сумма аминокислот	48,9	51,8
Липиды	6,08	6,13

Оба препарата мало различаются и по аминокислотному составу.

§ 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЯХ

К кислородсодержащим соединениям относятся окисленные парафины. Как субстрат для выращивания микроорганизмов они обладают рядом технологических преимуществ по сравнению с обычными парафинами. Имея более высокую растворимость в воде, обусловленную наличием гидрофильных группировок, окисленные парафины легче усваиваются микроорганизмами, что позволяет сократить длительность их выращивания. Вследствие хорошей растворимости отпадает необходимость в оборудовании ферментаторов сложными приспособлениями для перемешивания и аэрации. Процесс культивирования микроорганизмов в присутствии окисленных производных парафинов сопровождается менее интенсивным тепловыделением, что позволяет снизить затраты на охлаждение аппаратов, а изменение поверхностно-активных свойств субстрата способствует уменьшению пенообразования.

К недостаткам культивирования микроорганизмов на окисленных углеводородах можно отнести низкий выход биомассы в процессе ферментации (так как доля углерода по массе в низкомолекулярных кислородсодержащих соединениях намного меньше, чем в парафинах), усложнение аппаратурного оформления процесса подготовки сырья и неизбежность значительных потерь (до

15—20% парафина) в виде углекислого газа и воды в результате жесткого режима окислительной обработки (температура 100—200° С, давление 0,1—0,9 МПа), обязательность стадии экстракции окисленных соединений в сочетании с низкими степенями конверсии парафина (10—15%) за один проход.

Источниками углерода при культивировании микроорганизмов на кислородсодержащих соединениях являются жирные спирты (метиловый, этиловый, бутиловый, амиловый), моно- и дикарбоновые кислоты (в основном C_{12}—C_{17} при концентрации 0,1—0,2%) и их соли, алифатические соединения (в основном отходы производства капролактама и синтетических жирных кислот) и др.

Жирные спирты — наиболее простые продукты окисления углеводородов — могут использоваться в качестве единственного источника углеродного питания. Среди низших первичных спиртов для развития дрожжей Candida наиболее пригодны метиловый, этиловый, бутиловый и амиловый спирты. Октиловый спирт подавляет рост дрожжей, а дыхание клеток в его присутствии лишь незначительно отличается от эндогенного. Цетиловый спирт потребляется дрожжами Candida rugosa в концентрации 0,1—0,3%, при этом наблюдается незначительный прирост биомассы.

Моно- и дикарбоновые кислоты могут усваивать в качестве единственного источника углерода некоторые виды дрожжей Candida и Rhodotorula, растущие на средах с углеводородами, но не растущие на метилкетонах, однако использующие их в энергетическом обмене. Наилучшими субстратами среди монокарбоновых кислот являются кислоты C_{12}—C_{17} в концентрации 0,1—0,2%. Карбоновые кислоты средней молекулярной массы (C_6—C_{10}) усваиваются при условии снижения концентрации до 0,02—0,05%, а в концентрации 0,1% и выше подавляют рост клеток.

Избирательное отношение дрожжей к различным органическим кислотам зависит от проницаемости клеточной оболочки. Прекращение роста при достижении определенных концентраций кислот, по-видимому, связано с наличием недиссоциированных молекул субстрата. В отличие от свободных молекул ионы RCO^- обладают менее выраженным ингибирующим свойством. Поэтому

соли карбоновых кислот усваиваются дрожжами лучше, чем соответствующие им кислоты, их оптимальные концентрации в среде выше, однако закономерность влияния длины углеводородного радикала в процессе выращивания сохраняется.

Дикарбоновые кислоты потребляются многими видами дрожжей Candida, растущими на углеводородах, хотя в меньшей степени, чем монокарбоновые. Изучение кинетики потребления различных органических кислот дрожжами Candida показало, что накопление биомассы при развитии на смеси моно- и дикарбоновых кислот имеет ярко выраженный двухстадийный характер. Специальными опытами с применением меченых индивидуальных органических кислот установлено, что явление вторичного роста обусловлено последовательностью ассимиляции конкурирующих компонентов смеси: дикарбоновые кислоты потребляются после того, как из среды исчезают монокарбоновые кислоты.

Карбонильные соединения (метилкетоны $C_3 - C_8$) используются дрожжами в качестве источника энергии, причем с увеличением длины углеродной цепи кетона окислительная активность дрожжей возрастает. Однако способность поддерживать рост дрожжей у метилкетонов значительно слабее, чем у других кислородсодержащих соединений.

Изменение положения карбонильной группы, разветвление или циклизация углеродной цепи, введение двойной связи или второй карбонильной группы делают кетоны малопригодными для роста дрожжей. Так, циклогексанон, являющийся компонентом сточных вод производства капролактама, в низких концентрациях (до 0,3%) может обеспечить рост Candida guilliermondii, более высокие концентрации кетона действуют на рост дрожжей угнетающе.

Значительно менее изучены в качестве источника углеродного питания микроорганизмов би- и полифункциональные кислородсодержащие производные углеводородов. Кроме упоминавшихся выше дикарбоновых кислот, в качестве субстратов для выращивания различных культур могут использоваться некоторые низкомолекулярные окси- и кетокарбоновые кислоты (молочная, яблочная, пировиноградная), глицерины и некоторые сложные эфиры на основе глицерина и сорбита.

Исследования закономерностей роста дрожжей в присутствии кислородсодержащих алифатических соединений имеют практическое значение при решении вопросов биологической очистки сточных вод.

Технологическая схема получения белковых препаратов при культивировании микроорганизмов на кислородсодержащем сырье, хорошо смешивающемся с водой, не отличается от подобных схем при использовании углеводных источников питания. Особенностью схемы является лишь получение исходного сырья.

Синтетические кислородсодержащие соединения получают в отдельном узле, состоящем из трех отделений: окисления, экстракции и продувки. Окислению могут подвергаться углеводороды, начиная с метана и кончая кипящими при 450 °C (т. е. C_{30}). Исходное сырье (индивидуальный углеводород или смесь углеводородов) подается в отделение окисления, где окисляется до спиртов при сравнительно небольшой степени конверсии (10—15%) за один проход. Окисление ведется при повышенной температуре и избыточном давлении каталитическим и некаталитическим путем (при получении спиртов в присутствии борной кислоты). Реакционная смесь из отделения окисления поступает в отделение экстракции, где из нее экстрагируются продукты окисления водой или водно-солевой средой, используемой для ферментации. Для нейтрализации органических кислот в солевую экстракционную среду вводится водный аммиак. Полученный экстракт направляется на ферментацию, а непрореагировавшие углеводороды возвращаются в зону окисления.

При окислении бензиновых, керосиновых и газойлевых фракций нефти, а также жидких и твердых парафинов каталитическим путем по типу производства синтетических жирных кислот образовавшиеся продукты окисления также экстрагируются водой. Например, окислению подвергают *н*-парафины C_{20}—C_{25} при температуре 100—200° C и атмосферном давлении в присутствии перманганата калия. Выход окисленных продуктов составляет 80—86% от исходных парафинов. Или окислению подвергают фракцию нефти, выкипающую в пределах 50—130° C, содержащую 51% нафтеновых углеводородов, 30% *н*-парафинов, 12% изопарафинов и 7% ароматических углеводородов. Катализатор окисления — нафтенат кобальта,

температура — 160° С, давление 3,6 МПа, выход оксидата 80%. Получаемую в результате окисления смесь в количестве 1% вводят в водно-солевую среду, на которой выращивают микроорганизмы.

В зависимости от используемого субстрата существует несколько технологических схем производства белковых препаратов.

ВЫРАЩИВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА МЕТИЛОВОМ СПИРТЕ

Характеристика сырья и способы его получения

Основными преимуществами метилового спирта как субстрата для выращивания микроорганизмов и получения кормового белка являются устойчивость его химического состава, отсутствие полициклических примесей, хорошая растворимость в воде, летучесть (что позволяет легко освобождать продукт от его остатков). Значение метилового спирта как субстрата для выращивания микроорганизмов особенно стало заметно в последние годы в связи с разработкой новых эффективных способов его производства.

Метиловый спирт может быть получен из природного газа, продуктов сырой нефти, таких, как лигроин (нафта), тяжелого дизельного масла, из угля. В зависимости от используемого сырья процесс получения метилового спирта включает различные этапы подготовки и собственно синтеза продукта. На рис. 90 приведена схема основных этапов синтеза метилового спирта из природного газа и тяжелого топливного масла. Процесс получения метилового спирта из тяжелого масла значительно сложнее, включает большее число подготовительных процессов, чем синтез его из природного газа. Стоимость получения метилового спирта из природного газа, нефти, тяжелого дизельного масла и угля находится в следующем соотношении: 1,0:1,05:1,3:1,6.

При производстве метилового спирта из природного газа или нефти используется каталитическое переформирование паров и получение необходимого синтетического газа, тогда как из тяжелого масла синтетический газ получается в результате частичного окисления. Собственно синтез метилового спирта из окиси углерода и водоро-

да осуществляется в присутствии специального катализатора при повышенном давлении. Различают процессы синтеза при сверхвысоком давлении (до 30 МПа) и невысоком давлении (до 10 МПа).

Наиболее эффективным в настоящее время является поточный процесс получения метилового спирта при низ-

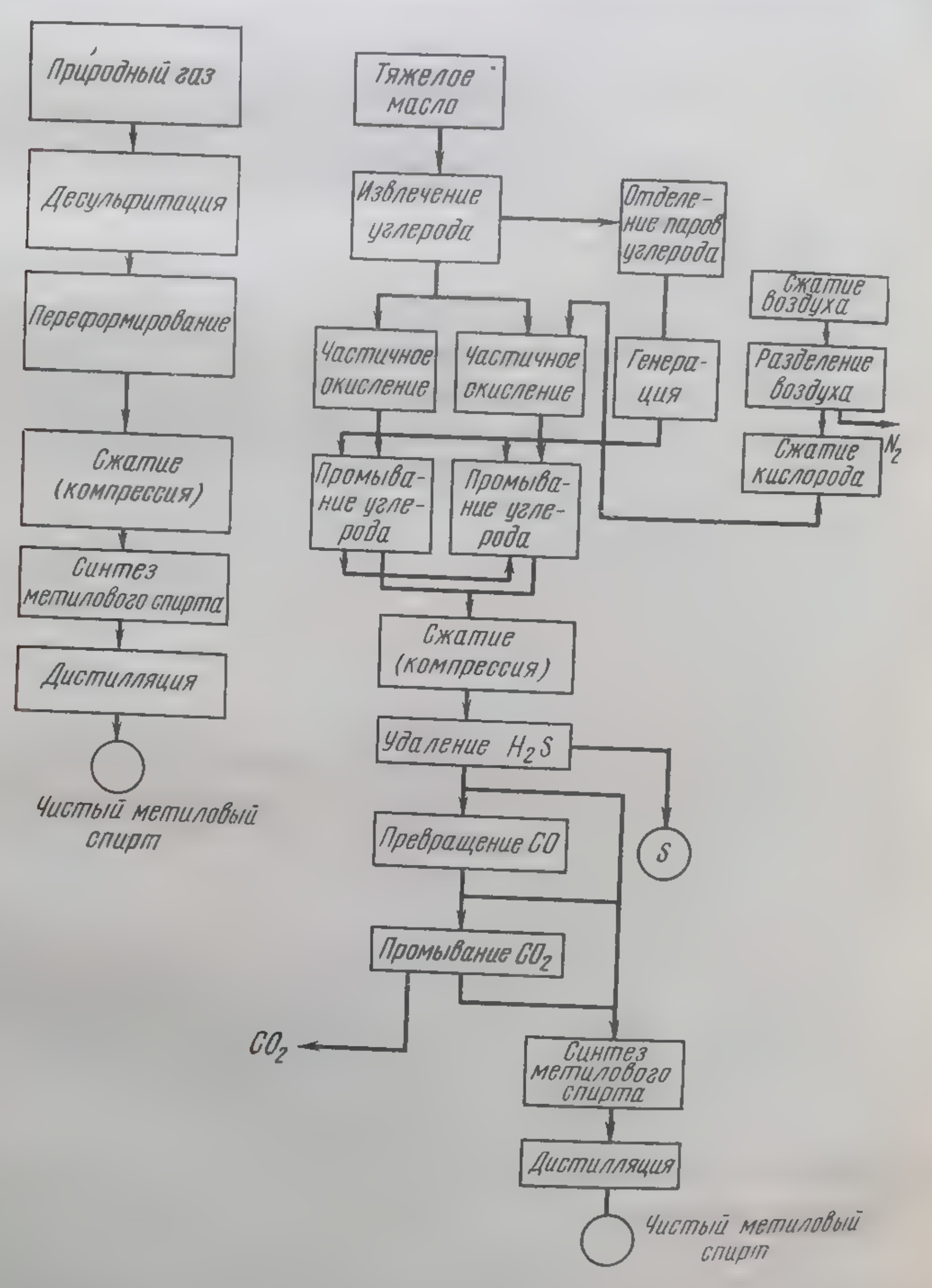


Рис. 90. Основные этапы синтеза метилового спирта из природного газа и тяжелого топливного масла.

ком давлении (5—10 МПа), разработанный в Великобритании.

В ФРГ исследуются способы получения метилового спирта с использованием тонкоизмельченного угля вместо тяжелого масла для частичного окисления и с применением для нагрева тепла высокотемпературного ядерного распада вместо обычного топлива.

Микроорганизмы — продуценты белка

Способность ассимилировать метиловый спирт в качестве единственного источника углерода особенно хорошо выявлена у дрожжей, в частности Candida silvicola, Candida boidinii, Hansenula polymorpha, Torulopsis glabrata, Torulopsis ernobii. Среди этих видов дрожжи T. ernobii обладают несомненными преимуществами по сравнению с другими видами, усваивающими метиловый спирт, так как низкое оптимальное значение pH уменьшает возможность бактериального заражения процесса, а оптимальная температура (37° C) снижает затраты на охлаждение ферментатора.

Среди бактерий, способных усваивать метиловый спирт в качестве единственного источника питания, известны некоторые виды родов Pseudomonas и Methylomonas: Ps. methylotropha, Ps. rosea, Meth. methanolica.

При росте микроорганизмов, усваивающих метиловый спирт, в среду выделяются сложные органические вещества. Обычно от 5 до 10% находящегося в питательной среде метилового спирта превращается в другие продукты, которые могут являться ингибиторами роста. Это позволило использовать для культивирования микроорганизмов — продуцентов белка — смеси культур, среди которых одна или несколько не потребляют метиловый спирт. Выход белка при использовании таких смешанных культур значительно увеличивается.

Harrison описал смесь культур, состоящую из пяти компонентов, способных расти на метиловом спирте, как единственном источнике углерода. При этом одна из культур (EN) потребляет только метиловый спирт, другие — субстраты, не содержащие C_1-компоненты. Эти четыре культуры идентифицированы как Pseudomonas sp., Acinetobacter sp. и Curtobacterium 13 и 47. Оптимальный рост EN культуры наблюдался только в присутствии в среде всех четырех культур. И, напротив, рост остальных четырех культур проявлялся только в присутствии в среде культуры, утилизирующей метиловый спирт. От-

носительное количество четырех других культур микроорганизмов в смеси может изменяться в зависимости от скорости разбавления — от 0,8 до 7,6% от общего количества клеток.

Преимуществами использования смеси культур по сравнению с одной культурой являются более высокая скорость роста (EN проявляет максимальную скорость роста при скорости протока 0,2 $ч^{-1}$, смесь культур — при 0,64 $ч^{-1}$), больший коэффициент выхода (максимальный молярный выход смеси культур 16,6; одной культуры EN—9,6), большая устойчивость к заражению, снижение возможности вспенивания, возможное повышение оптимальной температуры культивирования (в некоторых случаях до 65° С), утилизация из среды веществ — ингибиторов для культур, продуцирующих белок.

Пути окисления метилового спирта микроорганизмами

У большинства микроорганизмов, утилизирующих метиловый спирт, процесс окисления проходит через формальдегид и уксусную кислоту до CO_2 (рис. 91, *а*). При окислении каждый C_1-компонент выделяет 2 электрона, которые переносятся на коэнзимы метанолдегидрогеназы (X — феназинметасульфат — искусственный акцептор электронов у бактерий и ФАД — у дрожжей), формальдегиддегидрогеназы (Y — 2,6-дихлорфенол, индофенол — искусственный акцептор электронов или $НАД^+$) и формиатдегидрогеназы (НАД).

Некоторые бактерии, утилизирующие метиловый спирт, окисляют формальдегид через циклический путь (рис. 91, *б*), а не через формиат, как промежуточный окисленный продукт.

По обоим путям при окислении 1 молекулы формальдегида образуется 2 молекулы восстановленного кофермента и 1 молекула CO_2, в то время как по первому пути окисления (через формиат) только НАД служит коэнзимом для формальдегид- и формиатдегидрогеназ. Ферменты, включенные в циклический путь окисления, используют в качестве акцепторов электронов как $НАД^+$, так и $НАДФ^+$.

Теоретически основное количество энергии в форме АТФ должно генерироваться на первом этапе окисления метилового спирта до формальдегида. Если бы это было

так, то молярный выход микроорганизмов M (в г сухой биомассы клеток на 1 моль утилизированного субстрата) при использовании метилового спирта был бы выше, чем при использовании формальдегида. Но так как естественный коэнзим метанолдегидрогеназы неизвестен (ее активность измеряется с феназинметасульфатом в качестве искусственного акцептора электронов), невозможно

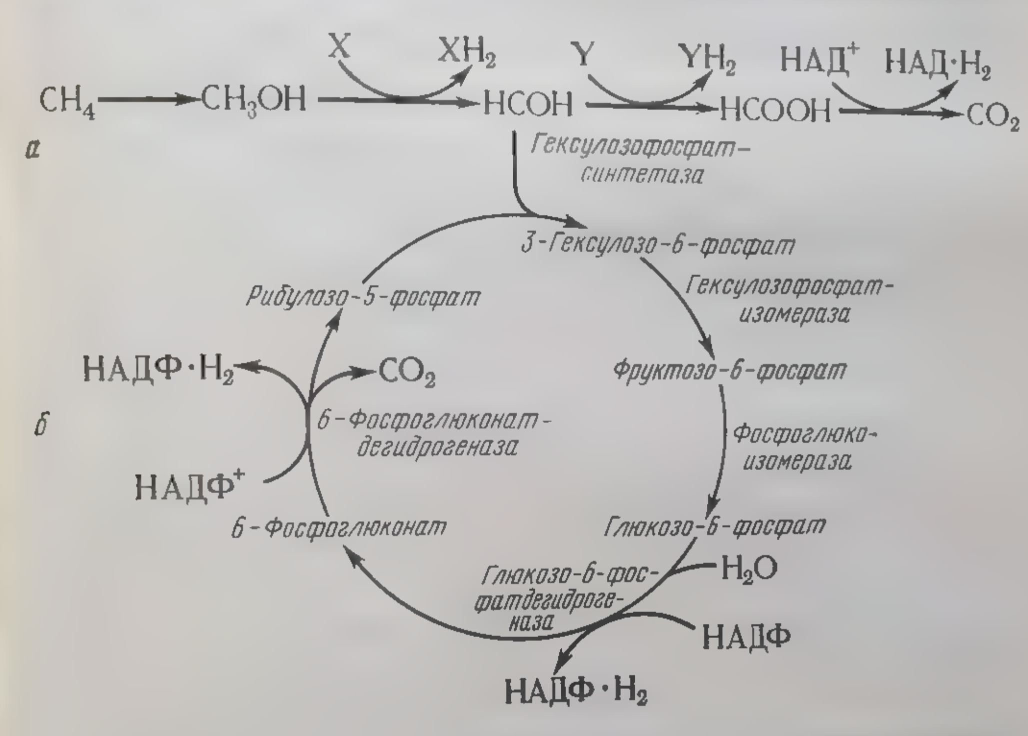


Рис. 91. Пути окисления метилового спирта C_1-ассимилирующими бактериями.

узнать количество энергии, выделяющееся при окислении метилового спирта до формальдегида.

У микроорганизмов, утилизирующих метиловый спирт, помимо рибулозомонофосфатного цикла фиксации формальдегида, общего для всех C_1-утилизирующих микроорганизмов, большое значение имеет сериновый путь (рис. 92). Оба пути лежат в основе синтеза C_3-компонентов из C_1-единиц. В отличие от рибулозомонофосфатного цикла, исключающего конденсацию C_1-единиц с C_5-сахарофосфатом, сериновый путь основан на конденсации C_1-единиц (формальдегида и CO_2) с C_2-(глицин) и C_3-(фосфоенолпировиноградной кислотой) компонентами. Кроме того, различия заключены в природе акцеп-

тора молекул: по рибулозомонофосфатному пути фиксируется только формальдегид, тогда как по сериновому пути формальдегид фиксируется так же хорошо, как CO_2. Последнее различие особенно важно при определении потребности в АТФ.

Для расчета теоретического выхода биомассы van Dijken и Harder приняли следующие условия: ассимиля-

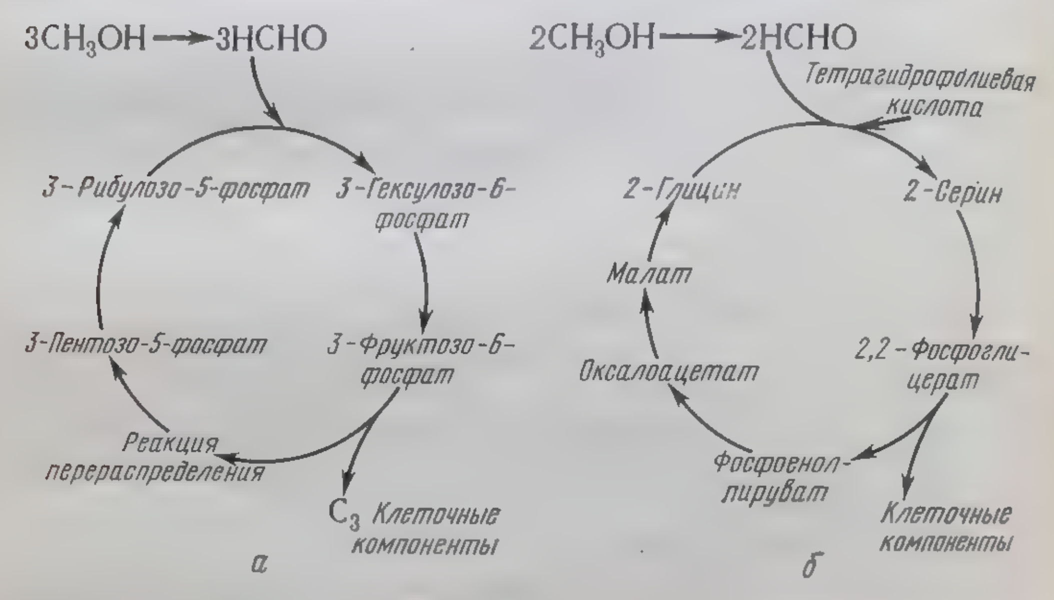


Рис. 92. Схематическое изображение фиксации формальдегида по рибулозомонофосфатному (*а*) и сериновому (*б*) циклам.

ция C_1-компонентов происходит через 3-фосфоглицериновую кислоту, средний элементарный состав клеточного вещества $C_4H_8O_2N$; фиксируемое количество сухого клеточного вещества ν (в г СБ), образующееся при затрате одной молекулы АТФ при росте на глюкозе, в среднем равно 10,5. По данному значению ν (10,5) и числу молекул *n* АТФ, образуемых в процессе оксидации на один атом субстрата, можно рассчитать теоретический молярный выход микроорганизмов $Y = \nu n$. Достижение теоретического выхода невозможно, так как в действительности значение ν АТФ для бактерий, утилизирующих метиловый спирт, значительно ниже 10,5. Действительные значения молярного выхода для различных видов микроорганизмов приведены в табл. 34.

Измеренные зависимости выхода биомассы микроорганизмов, утилизирующих метиловый спирт по двум путям, показали некоторую зависимость выхода от скорости

Таблица 34

Бактерии	Y, г СБ на 1 моль CH_3OH	μ_{max}, $ч^{-1}$	Эффективность*, %	Количество потребленного азота, %
Рибулозомонофосфатный путь				
Pseudomonas C	17,3	0,49	67,5	13,2
Pseudomonas methanolica	17,0	0,63	66,5	11,0
Methylomonas methanolica	15,7	0,52	62,0	11,7
Сериновый путь				
Pseudomonas 1	12,1	0,176	47,5	11,37
Pseudomonas 135	12,1	0,140	47,5	11,48
Pseudomonas AM-1	9,8	0,093	37,6	11,20
Pseudomonas M-27	13,1	0,108	51,0	9,40
Pseudomonas rosea	13,1	0,150	51,0	10,60

* Эффективность превращения углерода из метилового спирта до клеточного углерода.

роста при непрерывном культивировании. При постоянной скорости разбавления в хемостате эффективность ассимиляции углерода составляет для различных бактерий от 37,6 до 67,5% в зависимости от максимальной скорости роста.

Молярный выход биомассы и эффективность ассимиляции углерода у бактерий, окисляющих метиловый спирт по рибулозомонофосфатному пути, был выше, чем у бактерий, ассимилирующих его по сериновому пути. Кроме того, первые бактерии обладают значительно более высокой скоростью роста на метиловом спирте, чем бактерии с сериновым циклом фиксации. Таким образом, для утилизации C_1-компонентов из среды бактерии с РМФ-путем ассимиляции наиболее экономичны.

Особенности процесса выращивания микроорганизмов на метиловом спирте

Потребление субстрата и рост биомассы

Реакция потребления субстрата — метилового спирта — растущими на нем микроорганизмами может быть

суммарно описана следующим стехиометрическим уравнением:

$$1,72CH_3OH + 0,23NH_3 + 1,51O_2 - 1,0\,(CH_{1,68}\,O_{0,36}\,N_{0,23}\text{ зола})^* + \\ + 0,72CO_2 + 2,94H_2O + 740\,000\text{ кДж}.$$

Эффективность этой системы зависит от следующих факторов:

1) от эффективности превращения углерода субстрата в клеточное вещество (основной фактор). Она определяется клеточным выходом (г СБ на 1 г потребленного вещества) или молярным выходом (г СБ на 1 моль утилизируемого субстрата). Общий выход белка зависит от выхода клеточного вещества и содержания белка в организме. Продуктивность определяется по известному уравнению $P = Dx = \mu x$;

2) от потребности клеток в кислороде. Зависимость между потребностью клеток в кислороде и выходом определяется на основе предположения, что единственными продуктами метаболизма являются CO_2 и H_2O при использовании в качестве источника азота аммиака. При производстве белка в условиях непрерывного процесса, когда C является лимитирующим фактором (хемостат), выход белка в пределах 0,3—0,5 г СБ на 1 г метилового спирта соответствует потребности клеток в кислороде соответственно в пределах 3,4 и 1,4 г O_2 на 1 г клеточного вещества;

3) от количества выделяемого тепла, избыток которого необходимо отводить для поддержания температуры выращивания на оптимальном уровне. В зависимости от оптимальной температуры (в пределах от 30 до 45° С) стоимость процесса отвода тепла может изменяться от 5 до 24% общей стоимости готового продукта.

На основании зависимости между тремя рассмотренными параметрами получено следующее уравнение для расчета относительной стоимости кормового белка OC:

$$OC = \left[0,5\left(\frac{0,45}{Y\text{ субстрата}}\right) + 0,1\left(\frac{\text{г }O_2/\text{г СБ}}{2,0}\right) + \\ + 0,2\left(\frac{\text{кДж/г СБ}}{7,5}\right)\right]/0,65.$$

Это соотношение основано на предположении, что стоимость источника углерода составляет 50% от конеч-

* $CH_{1,68}O_{0,36}N_{0,23}$ зола — клеточное вещество бактерий.

ной стоимости белка, а стоимость аэрации и отведения выделяемого тепла — 10 и 5% соответственно.

Известно, что концентрация метилового спирта в питательной среде 1,5% и выше ингибирует рост и развитие микроорганизмов. Общая зависимость удельной скорости роста дрожжей T. ernobii от начальной концентрации метилового спирта представлена на рис. 93.

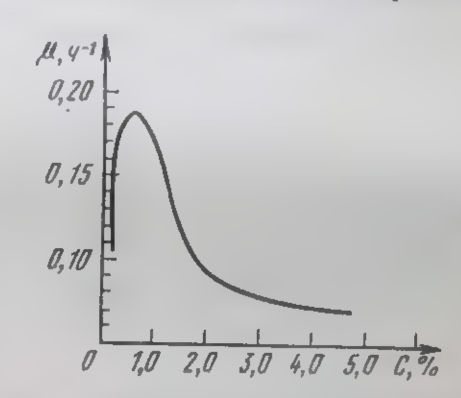


Рис. 93. Влияние концентрации метилового спирта в среде C (или S) на удельную скорость роста микроорганизма.

Максимальная удельная скорость роста (0,17 $ч^{-1}$) наблюдается при концентрации 0,5%. Эти данные хорошо описываются двумя кинетическими моделями: уравнениями Моно и неконкурентного ингибирования соответственно :

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad \text{при } 0 < S \leqslant 0{,}5\%,$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} K_i}{K_i + S} \quad \text{при } 0{,}5 < S \leqslant 4{,}0\%,$$

где K_S — константа насыщения субстрата (K_S = 0,498 мг/мл);
S — концентрация субстрата, мг/мл;
K_i — константа равновесия субстрата (K_i = 19,83 мг/мл).

На основании проведенных расчетов, а также учитывая особенности субстрата, установлено, что для получения белка на метиловом спирте наиболее экономичным является непрерывный процесс культивирования микроорганизмов.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на метиловом спирте

Состав питательной среды. В качестве источника азота микроорганизмы при росте на метиловом спирте могут использовать как неорганические соли, так и различные

органические препараты — пептон, кукурузный экстракт, дрожжевой автолизат и др. При этом предпочтение отдается органическим источникам, содержащим дополнительно различные биологические стимуляторы и витамины.

Изменение концентрации витаминов (биотина и тиамина) в синтетической среде, основным источником уг-

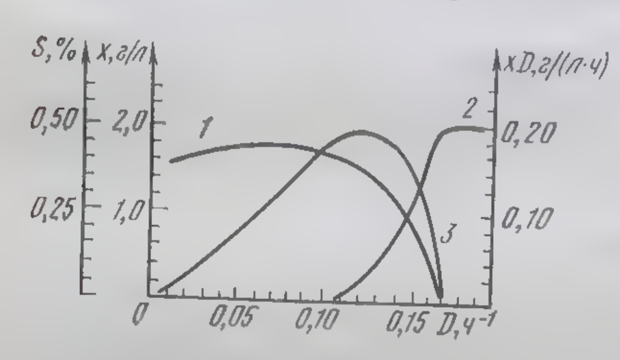


Рис. 91. Влияние скорости разбавления D на концентрацию клеточной биомассы x (1), метилового спирта S (2) и продуктивность xD (3).

Таблица 35

Концентрация витаминов, мкг/л		Удельная скорость роста μ, ч⁻¹	Концентрация дрожжевого экстракта, мг/л	Удельная скорость роста μ, ч⁻¹
биотина	тиамина			
0	0	0,076	0	0,049
10	100	0,110	50	0,060
20	200	0,090	200	0,058
40	400	0,093	300	0,056
80	800	0,095	400	0,061
			500	0,065
			600	0,060
			700	0,058

лерода в которой является метиловый спирт, не оказывает заметного влияния на продуктивность дрожжей (табл. 35).

Максимальная удельная скорость роста дрожжей наблюдается при концентрации биотина 10 мкг/л, тиамина 100 мкг/л и дрожжевого экстракта 50 мг/л.

Условия культивирования. Максимальная продуктивность бактерий родов Pseudomonas и Methylomonas, выращиваемых на метиловом спирте в непрерывном потоке, наблюдается при скорости разбавления в пределах 0,08—0,15 $ч^{-1}$. В частности, для культуры Ps. methylotropha максимальная продуктивность 10,196 г

СБ/(л·ч)] наблюдается при скорости разбавления $D=0{,}12$ ч$^{-1}$ (рис. 94). При этих условиях концентрация метилового спирта на выходе не превышает 0,012%. С увеличением скорости протока до 0,162 ч$^{-1}$ наступает полное вымывание клеток.

Установившееся состояние непрерывного процесса при оптимальной скорости разбавления достигается после

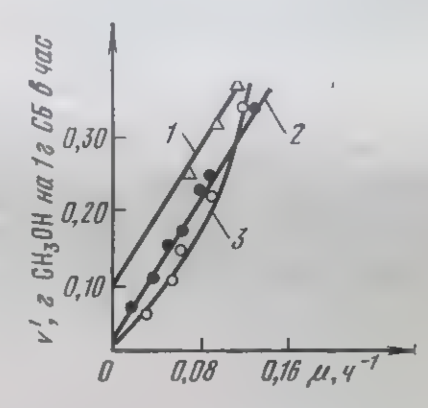


Рис. 95. Зависимость удельной скорости потребления метилового спирта от удельной скорости роста дрожжей (*1*) и бактерий (*2*, *3*).

четырехкратной смены рабочих объемов и установления постоянной концентрации биомассы.

Необходимые для определения оптимальных параметров культивирования коэффициенты продуктивности y_G и сохранения (поддержания) культуры m, а также скорость потребления метилового спирта и кислорода зависят от источника углерода, типа микроорганизма и скорости роста и могут быть найдены из уравнения

$$v' = \frac{1}{x}\left(\frac{dS}{dt}\right) = \frac{\mu}{y_G} + m,$$

где v' — удельная скорость потребления метилового спирта;
y_G — коэффициент продуктивности; когда μ приближается к бесконечности, $y_G = y_{x/S}$; $m = v'$, когда $\mu = 0$.

Зависимость v' от μ представлена на рис. 95. Коэффициент продуктивности можно подсчитать, учитывая угол наклона и величину отрезков координат соответственно. Прямая линия предполагает, что никаких других метаболитов, кроме CO_2 и H_2O, не образуется.

Уравнение можно представить как

$$y_{x/S} = \frac{\mu y_G}{\mu + y_G m},$$

т. е. в виде зависимости фактора выхода от удельной скорости (рис. 96). Максимальный достигаемый фактор выхода для дрожжей T. ernobii (0,39 г СБ на 1 г метилового спирта) наблюдается при $\mu = 0{,}12$ ч$^{-1}$.

Ниже представлены значения выхода биомассы (в г СБ на 1 г субстрата) для различных микроорганизмов, растущих на метиловом спирте:

Protaminobacter ruber	0,25
Pseudomonas extorquens (NT)	0,40
Pseudomonas extorquens (мутант)	0,47
EN (облигаты, утилизирующие метиловый спирт)	0,36
Смешанная культура (включающая EN)	0,52
Pichia pinus	0,36
Hansenula anomala	0,54

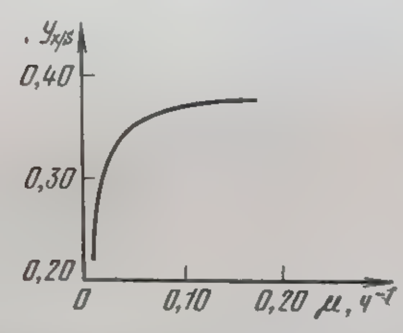


Рис. 96. Влияние удельной скорости роста на фактор выхода.

Потребность дрожжевых клеток в кислороде ($1/y_{x/O}$) можно рассчитать по следующему уравнению:

$$\frac{1}{y_{x/O}} = \frac{32C + 8H - 16O}{y_{x/S} - M} - 0{,}01O' - 0{,}0267C' +$$
$$+ 0{,}01714N' - 0{,}08H',$$

где C, H, O — число атомов углерода, водорода и кислорода соответственно в источнике энергии, в данном случае в метиловом спирте;

C′ — содержание углерода в дрожжевых клетках (C′=47%);
H′ — содержание водорода в дрожжевых клетках (H′=6,5%);
O′ — содержание кислорода в дрожжевых клетках (O′=31,5%);
N′ — содержание азота в дрожжевых клетках (N′=7,5%);
M — молекулярная масса метилового спирта (M=32).

Следовательно,

$$y_{x/O} = y_{x/S}/1{,}498 - 0{,}75.$$

По этому уравнению можно найти потребление кислорода, а также коэффициент продуктивности по кислороду y_{GO} и m_O. Соотношения между параметрами роста по этому уравнению даны в табл. 36.

Таблица 36

Параметры роста			
μ, $ч^{-1}$	v', г CH_3OH на 1 г СБ в час	v' O, г O_2 на 1 г СБ в час	Расчетные данные
Torylopsis ernobii			
0,011	0,030	0,041	m=0,01 г CH_3OH на 1 г СБ в час Y_G=0,407 г СБ на 1 г CH_3OH m_O=0,025 г O_2 на 1 г СБ в час Y_{GO}=0,498 г СБ на 1 г O_2
0,015	0,036	0,050	
0,033	0,075	0,093	
0,044	0,104	0,118	
0,054	0,126	0,142	
0,066	0,144	0,170	
0,080	0,209	0,226	
0,099	0,230	0,227	
0,108	0,244	0,229	
0,132	0,304	0,324	
0,135	0,345	0,374	
0,162	0,374	0,395	
Pseudomonas methylotropha			
0,075	0,234	0,249	m=0,063 г CH_3OH на 1 г СБ в час Y_G=0,431 г СБ на 1 г CH_3OH m_O=0,075 г O_2 на 1 г СБ в час Y_{GO}=0,455 г СБ на 1 г O_2
0,100	0,286	0,292	
0,125	0,350	0,350	
0,150	0,430	0,437	
0,200	0,670	0,725	
Pseudomonas rosea			
0,034	0,061	0,045	
0,065	0,117	0,086	
0,102	0,203	0,167	
0,138	0,321	0,293	
0,152	0,405	0,398	

Ниже дано влияние концентрации метилового спирта в среде на скорость дыхания бактерий Pseudomonas extorquens (в мкмоль O_2/мин):

$1{,}0\cdot10^{-5}$	30	1,0	112
$3{,}0\cdot10^{-5}$	60	2,0	75
$6{,}0\cdot10^{-5}$	75	3,0	65
$5{,}0\cdot10^{-4}$	111	5,0	0

Оптимальная температура роста микроорганизмов на метиловом спирте, так же как и на других субстратах,

зависит от индивидуальных особенностей используемого рода и вида микроорганизма. Отклонение температуры выращивания в ту или другую сторону от оптимальной (37° С) приводит к снижению продуктивности культуры микроорганизма. В частности, для дрожжей T. ernobii изменение температуры среды в пределах от 32 до 40° С оказывает заметное влияние на удельную скорость потребления субстрата (табл. 37).

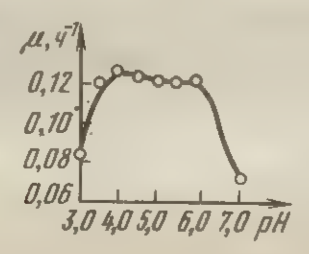


Рис. 97. Влияние величины pH на удельную скорость роста микроорганизма на метиловом спирте.

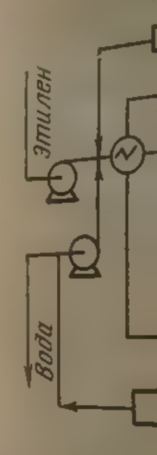
Изменение pH от 3,0 до 7,0 для данного вида дрожжей показало наибольшую удельную скорость роста при величине pH 4,0 (рис. 97).

Таблица 37

Температура, °С	v' (в г CH_3OH на 1 г СБ в час) в зависимости от концентрации метилового спирта, %		Температура, °С	v' (в г CH_3OH на 1 г СБ в час) в зависимости от концентрации метилового спирта, %	
	0,5	1,0		0,5	1,0
32	0,113	0,075	37	0,172	0,135
35	0,140	0,126	40	0,114	0,101

Таблица 38

Вид микроорганизма	Период удвоения, ч	pH	Температура, °С	Выход биомассы $y_{X/S}$, г СБ на 1 г CH_3OH
Candida silvicola	4	5	37	0,37
Torulopsis glabrata	8	3—8	30	0,45
Hansenula polymorpha	3	4—5	37	0,37
Candida boidinii	9	5	30	0,24
Torulopsis ernobii	5,8	4,0	37	0,39



Для других микроорганизмов, утилизирующих метиловый спирт, оптимальные значения pH и температуры, так же как и период удвоения биомассы, несколько иные (табл. 38).

ВЫРАЩИВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЭТИЛОВОМ СПИРТЕ

Характеристика сырья и его получение

Этиловый спирт является перспективным сырьем для выращивания на нем микроорганизмов — продуцентов белка. Это сырье как субстрат нетоксично, что дает воз-

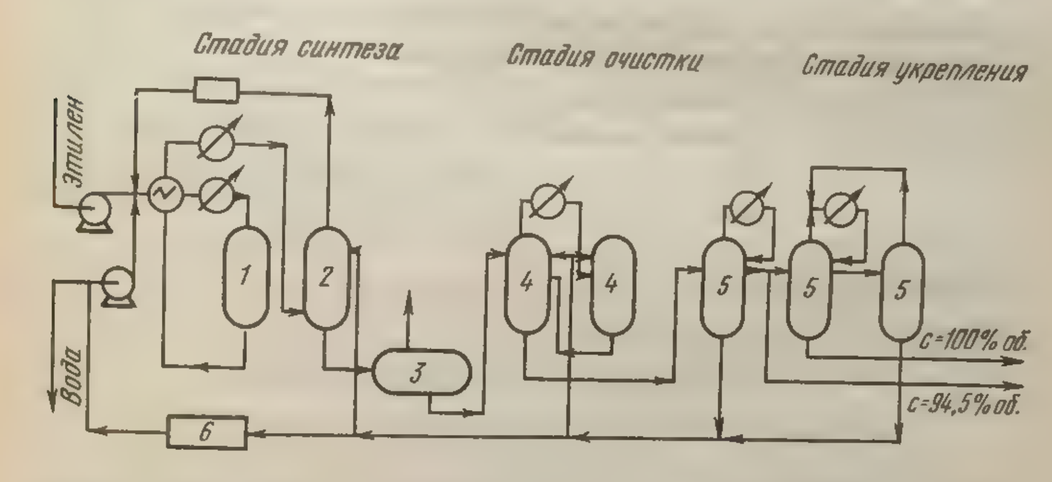


Рис. 98. Схема процесса получения этанола согласно VEBA-процессу:

1 — реактор; *2* — скруббер; *3* — резервуар неочищенного этилового спирта; *4* — аппараты предварительной очистки; *5* — аппараты ректификации; *6* — аппарат обессоливания отработанной воды.

можность получать готовый продукт, не требующий специальной очистки, хорошо смешивается с водой. При выращивании на нем дрожжей потребность в кислороде достаточно низка, так же как и выделение тепла.

Этиловый спирт получают сбраживанием углеродсодержащих продуктов, а также синтетически при каталитической гидратации этилена (способы VEBA, USI, ИСС и др.).

По способу VEBA (рис. 98) этилен и водяные пары предварительно нагревают в теплообменнике при давлении 7,0 МПа, повышая затем температуру до 230—250° С. Собственно синтез осуществляется в специальном реакторе.

Газ-носитель этилового спирта после синтеза охлаждают, этиловый спирт вымывают из газового потока водой, очищают дистилляцией и укрепляют ректификацией.

В настоящее время разрабатываются способы получения этилового спирта непосредственно из синтетического газа или из метилового спирта гомологизацией.

При использовании этилового спирта в качестве субстрата для производства белковых препаратов типичный выход белка составляет 0,7 г биомассы на 1 г субстрата.

Микроорганизмы — продуценты белка

На этиловом спирте как единственном источнике углерода могут расти и бактерии (Acetobacter, Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Hyphomicrobium, Nocardia, Pseudomonas), и дрожжи (Candida, Debaryomyces, Endomycopsis, Hansenula, Mycoderma, Pichia, Rhodotorula, Saccharomyces). Некоторые виды съедобных грибов, такие, как Zentinas, Pleurotus и Schizophillum, также растут на этиловом спирте.

Особенности процесса выращивания микроорганизмов на этиловом спирте

Потребление субстрата и рост биомассы

Наилучший рост некоторых микроорганизмов — продуцентов белка — наблюдается при начальной концентрации этилового спирта не выше 1%об. и поддержании этой концентрации в процессе культивирования. В частности, бактерии Acinetobacter calcoaceticus в этих условиях дают от 2,5 до 12,0 мг СБ/мл.

При культивировании микроорганизмов — продуцентов белка — на этиловом спирте в культуральной жидкости образуются уксусная кислота и ацетальдегид. Накопление этих продуктов метаболизма приводит к прекращению роста культуры, сокращению числа популяций.

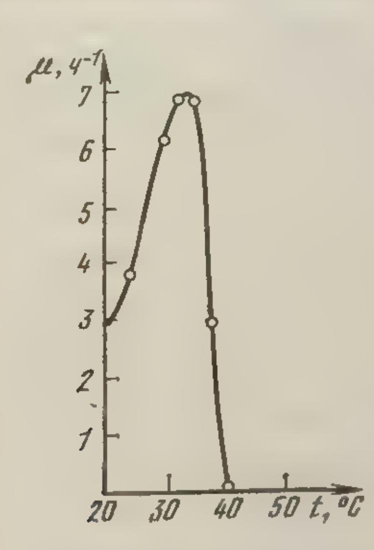
Исследования, проводимые с Acinetobacter calcoaceticus, штамм 4736, показали, что ацетальдегид в концентрации 0,01%об. снижает скорость роста на 80%. Степень снижения скорости роста при более низких концентрациях ацетальдегида трудно определить, так как образование ацетальдегида наблюдается раньше

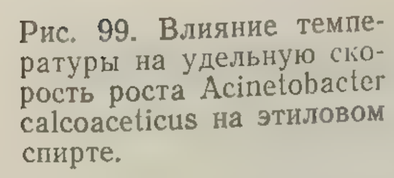
периода удвоения биомассы. Для исключения ингибирования роста микроорганизмов уровень ацетальдегида необходимо снижать до 0,001% об.

Исследования зависимости скорости роста от концентрации в среде этилового спирта и уксусной кислоты показали, что при их концентрации выше чем 1,0 и 0,1% об. соответственно скорость роста A. calcoaceticus снижалась ниже максимальной. Поддержание концентрации этилового спирта на уровне 1,0% об. и ниже обеспечивает оптимальные условия роста микроорганизмов.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов на этиловом спирте

Состав питательной среды. Для эффективного культивирования микроорганизмов на этиловом спирте необходимо наличие в составе питательной среды источников




Рис. 99. Влияние температуры на удельную скорость роста Acinetobacter calcoaceticus на этиловом спирте.

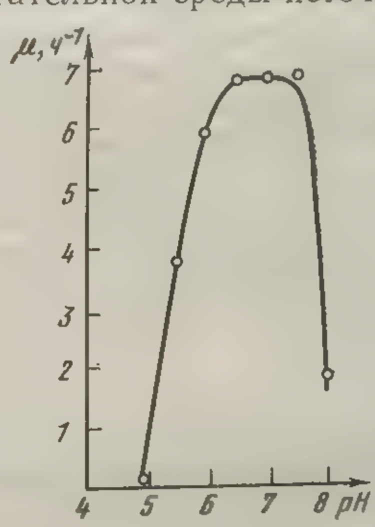


Рис. 100. Влияние pH на удельную скорость роста Acinetobacter calcoaceticus на этиловом спирте.

азота, фосфора и микроэлементов. Для азотного питания микроорганизмов могут использоваться различные органические и неорганические источники: пептон, аминокислоты, дрожжевые автолизаты, аммиак, аммонийные соли.

Добавки дрожжевого автолизата и биотина к синтетической среде с этиловым спиртом не оказывают заметного влияния на скорость его усвоения в процессе непрерывного культивирования. В частности, при культивировании штамма C. utilis 136А на синтетической среде, содержащей (в г/л): $(NH_4)_2HPO_4$ — 4,0; K_2SO_4 — 0,7; $(NH_4)_2HPO_4$ — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $CaCl_2 \cdot H_2O$—0,1; NaCl—0,1 и имеющей величину pH после стерилизации 4,5 (после охлаждения в среду добавлялось 2% об. этилового спирта), а также на средах с добавкой *D*, *L*-биотина (0,4 мкг/л), дрожжевого автолизата (0,1 г/л) и без добавок дрожжи при непрерывном культивировании росли хорошо, и выход биомассы к 120-му часу ферментации составлял в среднем 69,7% от внесенного в среду этилового спирта. Полученный белок дрожжей по своему составу ни в количественном, ни в качественном отношении не отличался от белка дрожжей, выращенных на природных субстратах.

Условия культивирования. Влияние температуры культивирования штамма Acinetobacter calcoaceticus на выход биомассы (удельную скорость роста) показано на рис. 99. Оптимальная температура культивирования находится на уровне 32—35° С.

Зависимость удельной скорости роста A. calcoaceticus на этиловом спирте от величины pH представлена на рис. 100. Оптимальная величина pH находится в пределах 6,5—7,5, но хороший рост наблюдается еще при pH до 5,5. При pH ниже 5 и выше 8 роста не наблюдается.

ВЫРАЩИВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ НА ОТХОДАХ ПРОИЗВОДСТВА КАПРОЛАКТАМА

Перспективным сырьем для микробиологического синтеза являются побочные продукты и отходы производства капролактама (сточные воды), получаемого методом жидкофазного окисления циклогексана, содержащие моно- и дикарбоновые кислоты в количестве 350—500 кг на 1 т получаемого товарного капролактама. Однако не все кислоты стоков одинаково хорошо используются дрожжами, а некоторые даже оказывают на микроорганизмы угнетающее действие. При этом характер отношения дрожжей к кислотам зависит не только от

Таблица 39

Кислота	Содержание кислот в стоке, % к суммарному количеству карбоновых кислот		
	№ 1 исходный без обработки	№ 2 после обессмоливания и выделения адипиновой кислоты	№ 3 после обессмоливания и выделения адипиновой кислоты, с повышенным содержанием капроновой кислоты
Муравьиная и уксусная	0,4	2,1	4,0
Пропионовая	1,2	Следы	—
Масляная	1,3	4,4	6,8
Изовалериановая	—	—	4,8
Валериановая	7,0	14,4	3,6
Капроновая	—	—	12,1
Янтарная	11,5	33,0	4,8
Глутаровая	8,6	14,2	12,1
Адипиновая	70,0	31,9	49,8

природы кислоты, но и от особенностей культуры, а также в известной мере от состава среды, в частности от наличия в ней других источников углерода.

Соотношение кислот, как видно из табл. 39, в отдельных партиях стока может меняться, но во всех случаях большую часть имеющихся кислот составляют: из дикарбоновых — янтарная, глутаровая и адипиновая, из монокарбоновых — валериановая и иногда капроновая.

Кислоты стоков в концентрациях, в которых их вносят в среду (от 0,4—0,8 до 2,0%), используются дрожжами в качестве единственного источника углерода.

Обе монокарбоновые кислоты, введенные в среду как без другого источника углерода, так и на фоне стоков, а также в смеси стоков с парафинами, в концентрации свыше 2% угнетают рост дрожжей. Однако угнетающие концентрации могут меняться в зависимости от состава среды. Для дикарбоновых кислот угнетающая рост дрожжей концентрация несколько ниже — 1—2%.

Пятикратный возврат культуральной жидкости, получаемой после роста дрожжей на очищенных стоках, не приводит к видимому подавлению роста дрожжей. Наоборот, при возврате накапливается больше биомассы, чем без возврата в расчете на одно и то же количе-

ство кислот, как в случае коротких циклов выращивания на свежей среде, так и при длительном выращивании с дробным введением стоков в старую среду, т.е. при возврате отработанной культуральной жидкости не накапливаются токсические для роста дрожжей вещества, какими могут быть валериановая кислота, циклогексанон или циклогексанол.

В результате длительного выращивания штаммов дрожжей в проточной культуре на очищенных и неочищенных стоках производства капролактама, содержащих карбоновые кислоты, отобраны два штамма, активно усваивающие моно- и дикарбоновые кислоты стоков и обеспечивающие высокий выход биомассы при скорости разбавления 0,10—0,12 $ч^{-1}$: C. guilliermondii Щ-4 и C. mycoderma Щ-1 (табл. 40).

Выход биомассы у шести испытанных культур, выращенных на неочищенных стоках, несколько выше, чем при использовании очищенных стоков. Это объясняется присутствием в неочищенных стоках неидентифицированных органических соединений (3—4% от общей суммы кислот), которые потребляются дрожжами наряду с органическими кислотами. По содержанию P_2O_5 и золы дрожжи, выращенные на отходах производства капролактама, идентичны кормовым дрожжам и отличаются от последних повышенным содержанием белка. По цвету дрожжи, выращенные на неочищенных стоках, несколько темнее дрожжей, выращенных на очищенных стоках.

Технологические показатели (допустимая концентрация карбоновых кислот в исходной питательной среде, выход биомассы и скорость процесса) уточнены в условиях аэрации воздухом на лучших из испытанных штаммов дрожжей: C. guilliermondii H-249 и Щ-4. Оба штамма длительно выращивали на различных образцах неочищенного водно-щелочного стока при концентрации карбоновых кислот в среде 0,75—1,0% и скорости разбавления 0,10—0,12 $ч^{-1}$. С увеличением концентрации карбоновых кислот до 1% выход абсолютно сухой биомассы дрожжей у штамма C. guilliermondii H-249 был на 12—20% ниже, чем в опытах с 0,5% карбоновых кислот. Выход абсолютно сухой биомассы у штамма C. guilliermondii Щ-4 оставался примерно таким же, как при выращивании на среде с 0,5% карбоновых кислот: от 90 до 97%.

Таблица 40

Культура	Время, ч	Выход, % к массе карбоновых кислот		Содержание в сухих дрожжах, %			Соотношение культур к концу опыта, %		
		СБ	неочищенной СБ	белка	P_2O_5	золы	засевная культура	Щ-1	Trichosporon sp.
Очищенный сток									
C. guilliermondii H-249	204	67,0	84,5	64,0	4,1	6,3	26	64	10
C. guilliermondii Щ-4	173	76,0	87,3	66,5	3,8	5,5	60	30	10
C. guilliermondii ЛС-2	154	53,0	63,8	60,2	4,2	6,0	20	67	13
C. mycoderma Щ-1	190	65,0	83,0	64,5	4,4	6,2	82	0	18
C. species N-6	188	50,0	66,0	66,3	3,9	5,4	1,5	40	58
Tr. pullulans	208	67,0	84,0	63,8	4,4	6,6	0	80	20
Неочищенный сток									
C. guilliermondii H-249	204	75,3	91,3	56,8	3,9	5,8	30	60	10
C. guilliermondii Щ-4	180	91,5	105	54,5	4,9	5,8	77	15	8
C. guilliermondii ЛС-2	154	57,0	65,0	58,3	4,0	6,5	40	53	7
C. mycoderma Щ-1	190	78,4	94,0	61,4	4,1	5,9	92	92	8
C. sp. N-6	188	55,0	71,5	64,2	3,7	5,1	20	70	10
Tr. pullulans	208	72,0	92,0	64,2	3,8	6,8	0	95	5

Ассимиляция дрожжами карбоновых кислот при содержании их в питательной среде 1% была довольно высокой: для штамма C. guilliermondii Н-249 — в пределах 82—87%; для штамма C. guilliermondii Щ-4—90—92%, а количество оставшихся органических кислот в отработанной культуральной жидкости в пересчете на адипиновую кислоту не превышало 0,1%. При увеличении концентрации карбоновых кислот в среде до 1,25% наблюдалось резкое снижение ассимиляции карбоновых кислот дрожжами и уменьшение выхода биомассы (до 30—35%).

ВЫРАЩИВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ, ИСПОЛЬЗУЮЩИХ ГЛИЦЕРИН В КАЧЕСТВЕ ЕДИНСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА УГЛЕРОДА

Представляется целесообразным использовать в качестве субстрата для биосинтеза белка отходы производства синтетического глицерина — кубовые остатки, которые содержат до 50—70% глицерина и 30—50% хлористого натрия. Исследованиями, проведенными во ВНИИсинтезбелок, был выявлен ряд культур дрожжей родов Candida и Rhodotorula, активно усваивающих глицерин. Однако присутствие в среде NaCl обусловливает повышение осмотического давления раствора, что приводит к изменению внутриклеточного давления микроорганизмов. Известно, что повышение осмотического давления до определенного предела не только не снижает жизнедеятельности клетки, но даже может стимулировать некоторые биохимические процессы. При этом воздействие на рост микроорганизмов повышенных концентраций веществ, вызывающих увеличение осмотического давления раствора, мо-

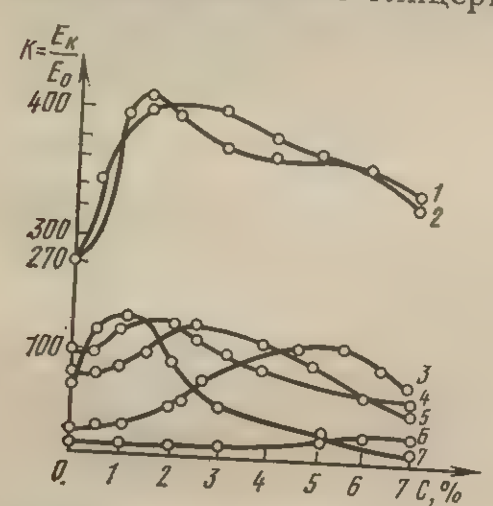


Рис. 101. Интенсивность роста K на глицерине в присутствии NaCl различной концентрации дрожжей штаммов:

1 — C. arborea 1257; *2* — C. reucaufii Н-221; *3* — C. tropicalis К-4; *4* — C. rugosa КР-15; *5* — C. guilliermondii НП-4; *6* — C. intermedia Н-30; *7* — Гr. cuteneum Н-222.

жно объяснить как влиянием этого давления, так и обычным химическим воздействием вещества.

Сустиной и Градовой изучалось воздействие разных концентраций NaCl на развитие дрожжей, активно ассимилирующих глицерин. Авторы исследовали способность семи штаммов дрожжей и грибов (C. arborea 1257, C. tropicalis К-4, C. rugosa КР-15, C. guillirmondii НП-4, C. reucaufii Н-221, Tr. cuteneum Н-222, C. intermedia Н-30), активно развивающихся на парафинах и гидролизатах, усваивать глицерин в качестве единственного источника углерода. Наибольшая активность роста была отмечена у C. arborea 1257 и C. reucaufii, которые на среде с глицерином накапливают биомассу так же интенсивно, как на среде с глюкозой. На рис. 101 представлены данные об интенсивности роста дрожжей на глицерине (1%) в присутствии различных концентраций NaCl (*С*). Содержание белка в дрожжах было нормальным — 57—58%.

ФЕНОЛ КАК ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Фенолы входят в состав швелевой воды, являющейся побочным продуктом пиролитических процессов. Проблема утилизации фенола микроорганизмами поможет решить вопросы очистки промышленных сточных вод.

Известно значительное число видов микроорганизмов, принадлежащих к родам Micrococcus, Mycoplana, Mycobacterium, Bacterium, Pseudomonas, Vibrio и Bacillus, которые могут развиваться на средах с фенолом, орто-, мета- и паракрезолом, нафталином, резорцином, толуолом и другими ароматическими соединениями.

В настоящее время способность различных видов бактерий метаболизировать ароматические углеводороды и их производные достаточно хорошо изучена. Более 100 соединений, относящихся к фенолам, бензоловым спиртам, бензальдегидам, бензолам, циклогексану и гетероциклическим соединениям, испытаны на возможность окисления микроорганизмами видов Pseudomonas, Achromobacter, Flavobacterium, Xhanthomonas. Данные микроорганизмы способны ассимилировать в качестве единственного источника углерода фенол, катехол, резорцин, хинон, 2,4,6-тринитрофенол, *м*-хлорфенол, тимол.

Способность окислять фенолы присуща ряду грибов, микобактерий, дрожжей.

При периодическом выращивании на феноле предварительно селекционированных адаптированных дрожжей наблюдается очень длительный лаг-период и очень короткий период роста, что обусловлено незначительным содержанием в среде источника углерода. После использования фенола дрожжами происходит быстрая деадаптация, и поэтому перед атакой следующей порции этого источника углерода клеткам снова необходим длительный лаг-период, в течение которого они снова подвергаются адаптации. При выращивании микроорганизмов на средах с фенолом наиболее перспективным является непрерывный процесс культивирования.

Предельные концентрации фенола, к которым отдельные культуры микроорганизмов способны адаптироваться, зависят от физиологических свойств микроорганизмов. В частности, при культивировании дрожжей Debaryomyces на среде с фенолом в концентрации 3, 6, 9 и 12 мг/мл было обнаружено, что даже при концентрации фенола 6,65 мг/мл микроорганизм адаптируется относительно легко как в проточном, так и в стационарном режимах культивирования. При повышении концентрации фенола ассимиляция значительно затрудняется. Период времени, необходимый дрожжам для окисления фенола, находится в прямой зависимости от количества субстрата в среде: чем больше концентрация фенола, тем медленнее протекает его расщепление.

Окисление фенола идет под действием ферментов, гидроксилирующих ароматическое кольцо, по следующей схеме:

Фенол $\xrightarrow{O}$ Пирокатехин $\rightarrow$ Цис-цис-2,4-гександиендиовая кислота $\rightarrow$ 4-Карбоксиметил-2-бутен-4-олид $\rightarrow$

$\rightarrow$ 4-Карбоксиметил-3-бутен-4-олид $\xrightarrow{H_2O}$ 3-Оксо-гександиовая кислота (β Оксоадипиновая кислота) $\xrightarrow{H_2O}$ CH_3COOH + CH_2COOH–CH_2COOH $\rightarrow$ ЦТК

Образующиеся уксусная и янтарная кислоты вступают затем в терминальный цикл трикарбоновых кислот, общий для всех микроорганизмов, утилизирующих различные субстраты (см. рис. 52).

§ 4. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ УГЛЕВОДОРОДНЫХ И КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Важнейшими параметрами, характеризующими используемые С-субстраты, являются выход биомассы (в кг СБ на 1 кг субстрата), тепловыделение при культивировании (в кДж/кг), удельная потребность в кислороде (в кг O_2 на 1 кг СБ), растворимость субстрата в культуральной жидкости (в кг субстрата на 1 $м^3$) и продуктивность (в кг СБ на 1 $м^3$ в час).

Кроме того, имеются и другие факторы, оказывающие непрямое влияние на эффективность использования субстрата, зависящие от того, какие микроорганизмы используются в качестве продуцента, — дрожжи или бактерии: отсутствие посторонних микроорганизмов в ферментаторе (величина pH); простота выделения клеточной массы из культуральной жидкости (размер клеток).

При выращивании микроорганизмов на *н*-парафинах в качестве продуцентов обычно используются дрожжи.

Преимуществами выращивания дрожжей — продуцентов белка — на *н*-парафинах являются высокий выход дрожжей, простота отделения клеточной массы, небольшие затраты на поддержание стерильности (обусловлено низкой величиной pH).

К недостаткам относятся высокая стоимость процессов выделения и очистки *н*-парафинов, высокое удельное потребление O_2, значительное тепловыделение при низком уровне оптимальной температуры роста, плохая растворимость субстрата, обусловливающая высокие затраты энергии на перемешивание; применение дополнительной очистки клеточной массы для снижения содержания остаточных парафинов; низкое содержание белка в биомассе.

При выращивании микроорганизмов на метиловом спирте преимущественными продуцентами являются бактерии.

Основными преимуществами выращивания микроорганизмов на метиловом спирте являются высокая чистота субстрата, его легкая растворимость в воде, хорошая смешиваемость (т. е. затраты энергии на перемешивание невелики), высокие оптимальные температуры в ферментаторе, легкость удаления остаточных количеств субстрата, высокая скорость роста микроорганизмов и высокое содержание белка в биомассе.

К недостаткам относятся низкий клеточный выход, высокие затраты на поддержание стерильности процесса (оптимальная величина pH 7,0), многостадийное отделение клеточной биомассы и высокое содержание нуклеиновых кислот в клеточной массе.

Таблица 41

Показатели	Субстрат		
	метиловый спирт	этиловый спирт	*н*-парафины
Микроорганизмы	В основном бактерии, немного дрожжей	В основном различные дрожжи	Различные дрожжи
Выход, кг СБ на 1 кг субстрата	0,50	0,70	1,0
Тепловыделение, кДж на 1 кг СБ	17,2	22,0	26,0
Температура культивирования, °С	37—40	30—32	30—32
Потребление O_2, кг O_2 на 1 кг СБ	1,4	1,65	2,1
Содержание сырого белка, %	80	55—60	55—60
Содержание нуклеиновых кислот, %	10—15	5—10	5—10
Преимущества	Простота получения в чистом виде, простота отделения от готового продукта, хорошая смешиваемость с водой		—
Недостатки	Необходимость дополнительной обработки для отделения биомассы	—	Почти полная нерастворимость в воде; экстракция готового продукта

Этиловый спирт как субстрат для выращивания микроорганизмов имеет один основной недостаток — высокую стоимость. Однако в технологическом отношении он обладает рядом преимуществ: хорошей растворимостью, простотой отделения остаточного количества субстрата, отсутствием затрат на поддержание стерильности и т. д. В табл. 41 даны суммарные критерии использования различных субстратов для выращивания микроорганизмов и получения белковых препаратов.

Потребление в процессе культивирования субстрата, кислорода и других источников питательных веществ микроорганизмами представляет цепочки сложных биохимических реакций, в которых как побочный продукт выделяется диоксид углерода. В природе эти реакции известны, поэтому легко можно определить минимальное количество CO_2, которое образуется при синтезе микробного белка по соответствующему пути биологической ассимиляции. Эффективность процесса культивирования может быть выражена количеством углерода потребляемого субстрата, непосредственно включаемого в клеточное вещество микроорганизмов. Рассчитанная максимальная эффективность потребления углерода (соответствующая минимальному выделению CO_2) часто находится в пределах 70%. На практике эта величина несколько ниже (в пределах 40—65%), так как в больших ферментаторах во всех их частях трудно создать условия, обеспечивающие оптимальный биологический путь потребления углерода: вместо более эффективного биологического процесса имеет место повышенное образование CO_2 и выделение тепла.

Потребность в кислороде и отвод тепла зависят от используемого субстрата и достигаемой эффективности потребления углерода, но мало зависят от вида используемых микроорганизмов. В зависимости от эффективности потребления углерода субстрата могут быть определены и потребность в кислороде, и необходимый отвод тепла.

Обозначим продукт идеальной эмпирической формулой $CH_{1,8}O_{0,4}N_{0,2}$. Эта формула близка к действительному составу белка дрожжей и бактерий, исключая золу и воду, которые не участвуют в процессе выделения тепла, и может быть получена из уравнений, приводимых ниже.

Теплота сгорания (ТС)Q 1 кг сухого белка, содержащего 46% углерода, обычно составляет 21,4 кДж. Теплота сгорания 1 г-моль белка $CH_{1,8}O_{0,4}N_{0,2}$, содержащего 1 г-атом углерода, соответственно будет равна

$$\frac{21,4\cdot 12}{0,46}=560\ \text{кДж}.$$

Проведем атомный и тепловой баланс. Изменения тепла рассчитываем из теплоты сгорания веществ, вступающих в реакцию, и веществ, получаемых в результате реакции (реактантов и результантов).

Теплота сгорания и изменение тепла в процессе ассимиляции некоторых субстратов следующие:

Углеводы:

$$\underset{448}{CH_2O}\,(\text{тв})+\underset{72}{0,2NH_3}-0,1\,O_2=CH_{1,8}\underset{560}{O_{0,4}}N_{0,2}+\underset{-40}{0,4\,H_2O}-\text{Тепло}.$$

Алканы:

$$\underset{640}{CH_2}\,(\text{ж})+\underset{72}{0,2\,NH_3}+0,4\,O_2=CH_{1,8}\underset{560}{O_{0,4}}N_{0,2}+\underset{152}{0,4H_2O}+\text{Тепло}.$$

Метиловый спирт:

$$\underset{696}{CH_3OH}\,(\text{ж})+\underset{72}{0,2NH_3}+0,4\,O_2=CH_{1,8}\,O_{0,4}\underset{560}{N_{0,2}}+\underset{+208}{1,4\,H_2O}+\text{Тепло}.$$

Метан:

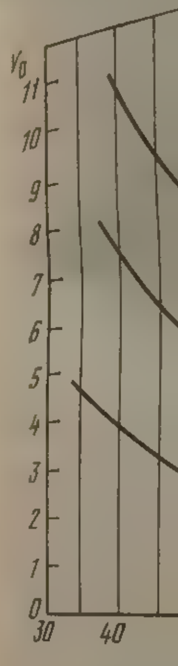
$$\underset{852}{CH_4}\,(\text{г})+\underset{72}{0,2\,NH_3}+0,9\,O_2=CH_{1,8}\,O_{0,4}\underset{560}{N_{0,2}}+1,4\,H_2O+\text{Тепло}.$$

Примечание. тв — твердый, ж — жидкий, г — газообразный.

Из этих уравнений ясно видны различия в потребности микроорганизмов в кислороде при использовании этих субстратов. Потребность в кислороде и необходимый отвод тепла в действительном процессе получения белка могут быть получены при объединении в соответствующие зависимости эффективности потребления углерода при окислении субстрата до CO_2 по следующим уравнениям:

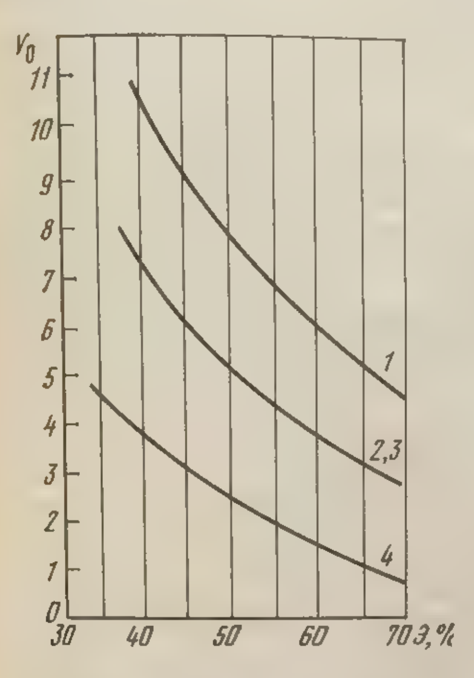
$$CH_2O\,(\text{тв})+O_2=CO_2+H_2O+448\ \text{кДж},$$
$$CH_2\,(\text{ж})+1,5\,O_2=CO_2+H_2O+640\ \text{кДж},$$
$$CH_3OH\,(\text{ж})+1,5\,O_2=CO_2+2H_2O+696\ \text{кДж},$$
$$CH_4\,(\text{г})+2\,O_2=CO_2+2H_2O+852\ \text{кДж}.$$

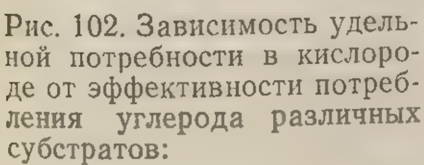
Эти зависимости приведены на рис. 102 и 103. Тепловыделение и потребность в кислороде микроорганизмов при выращивании на определенных субстратах связаны между собой довольно близко: во всех случаях, пред-



ставленных на рис. 103, тепловыделение составляло 12,8—14,4 кДж на 1 г используемого кислорода.

При культивировании микроорганизмов на метане потребности в кислороде велики, так как эффективность ассимиляции углерода метана низкая, а содержание водорода в молекуле субстрата велико. Процесс характе-




Рис. 102. Зависимость удельной потребности в кислороде от эффективности потребления углерода различных субстратов:

1 — метан; *2, 3* — *н*-алканы и метиловый спирт; *4* — углеводы.

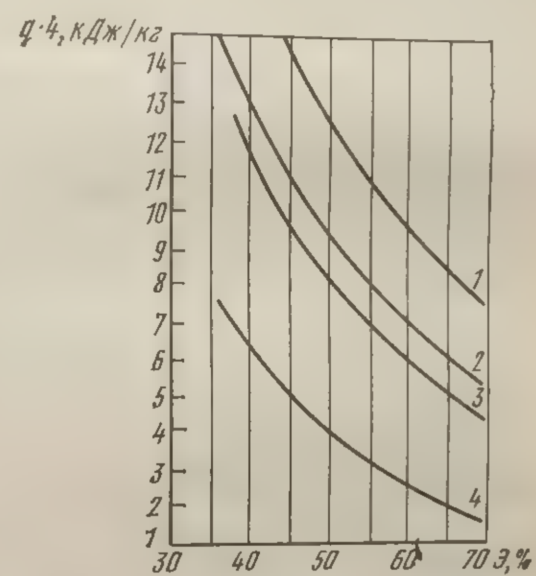


Рис. 103. Зависимость удельного тепловыделения *q* от эффективности потребления углерода различных субстратов:

1 — метан; *2* — метиловый спирт; *3* — *н*-алканы; *4* — углеводы.

ризуется значительным тепловыделением. Метиловый спирт и алканы как субстраты обладают одинаковыми потребностями в кислороде (метиловый спирт может быть представлен как гидратированный алкан $CH_2 \cdot H_2O$) и одинаковым тепловыделением.

Подача воздуха (кислорода) в ферментатор и отвод тепла, образующегося в процессе биосинтеза клеточного вещества, определяют основные затраты на производство белка. Поэтому при производстве кормового белка необходимо стремиться к увеличению эффективности потребления углерода и выбору соответствующего субстрата.

Часть III
ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ

Основными источниками липидов для человека в настоящее время являются растительные и животные организмы. Наряду с потреблением огромного количества жиров для пищевых целей значительная их часть используется и на технические нужды (производство мыла, лакокрасочная промышленность, смазки, металлургия и т. д.).

В настоящее время ведутся поиски новых, до сих пор неиспользованных источников производства жира. Таким источником могут стать микроорганизмы, которые уже зарекомендовали себя как своеобразные «фабрики» производства спирта, различных органических кислот, витаминов, белка, ферментов и пр. Кроме того, организация производства белковых препаратов на основе непищевого и особенно нефтехимического сырья открывает новые, дополнительные резервы получения липидной фракции микроорганизмов (микробных жиров) в процессе экстрактивной очистки биомассы от остаточных количеств углеводородов.

Исследования, проведенные в нашей стране, показали, что липиды микроорганизмов после соответствующей обработки могут быть использованы в различных отраслях промышленности: в медицинской, химико-фармацевтической, парфюмерной, лакокрасочной, шинной, кожевенной, горнорудной, металлургической и др., что позволит высвободить значительные количества жиров для пищевых целей.

Глава 1. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ

Технологический процесс получения микробных липидов, так же как любого другого продукта микробного

происхождения, включает стадии приготовления питательной среды, выращивания микроорганизмов, отделения биомассы микроорганизма от культуральной жидкости, плазмолиз и сушку. Технологическая схема получения микробных липидов в отличие от технологической схемы получения микробных белковых препаратов включает стадию выделения липидов из клеточной биомассы методом экстракции (схема 5). При этом одновременно получаются два продукта — микробный жир и обезжиренный белковый препарат.

Сырьем для получения микробного жира являются те же питательные среды, что и для получения белковых препаратов: гидролизаты растительных отходов, торф, молочная сыворотка, послеспиртовая барда, жидкие, газообразные и окисленные углеводороды.

В процессе культивирования микроорганизмов на различных субстратах можно получить все 3 класса липидов: простые, сложные липиды и их производные.

К простым липидам относятся нейтральные жиры и воски (схема 6). Нейтральные жиры (ацилглицерины, или глицериды) представляют собой эфиры глицерина и жирных кислот. Встречаются моноацилглицерины (если жирной кислотой этерифицирована одна гидроксильная группа глицерина), ди- и триацилглицерины (триглицериды):

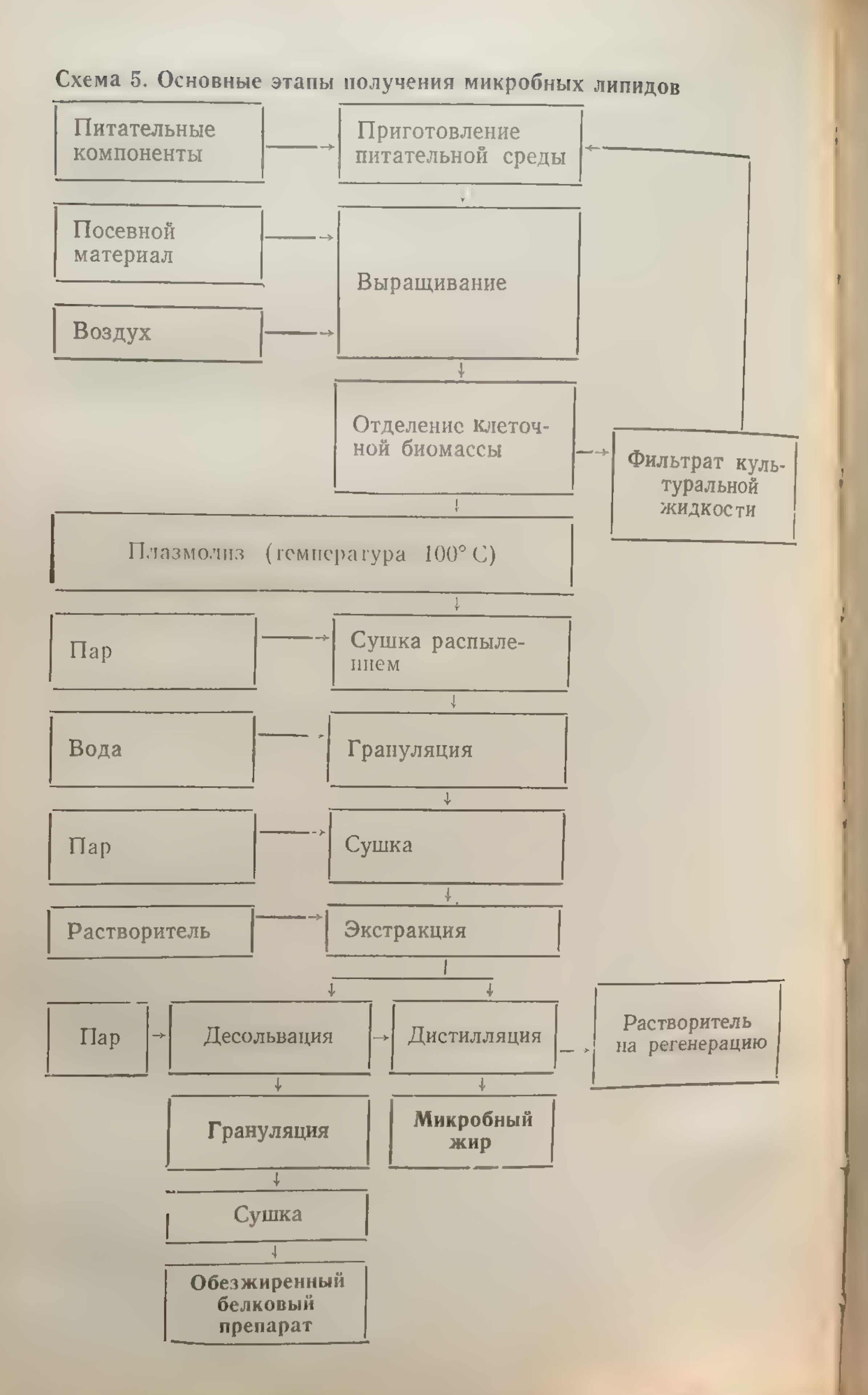
$$\begin{array}{c} H_2COCOR_1 \\ | \\ HCOH \\ | \\ H_2COH \end{array} \qquad \begin{array}{c} H_2COCOR_1 \\ | \\ HCOCOR_2 \\ | \\ H_2COH \end{array} \qquad \begin{array}{c} H_2COCOR_1 \\ | \\ HCOCOR_2 \\ | \\ H_2COCOR_3 \end{array}$$

1-Моноацилглицерин *1,2-Диацилглицерин* *Триацилглицерин*

Триацилглицерины составляют основную массу природных нейтральных жиров, являющихся основными запасными компонентами клетки.

У микроорганизмов нейтральные неполярные липиды, выполняющие роль энергетического ресурса, присутствуют в основном в дрожжах и мицелиальных грибах. Большинство бактерий лишены соответствующих ферментных систем и не могут использовать липиды как эндогенные запасные материалы, поэтому нейтральные липиды у бактерий составляют небольшую часть общей суммы липидов, представленной в основном сложными липидами.

Схема 5. Основные этапы получения микробных липидов



Воски — эфиры высших жирных кислот или монооксикислот и алифатических спиртов с длинной углеродной цепью, по своей структуре и свойствам близки к нейтральным липидам. Воск имеет общую формулу $R_1CH_2OCOR_2$ (где R_1CH_2OH — одноатомный первичный спирт; R_2COOH — жирная кислота). К воскам также относят эфиры холестерина, обнаруженные в дрожжах в количестве 0,7—1,5%, и эфиры витаминов A и D.

Сложные липиды микроорганизмов включают 2 больших класса соединений: фосфолипиды и гликолипиды. К фосфолипидам относятся фосфоглицериды и сфинголипиды.

Фосфоглицериды (глицерофосфаты) представляют собой эфиры глицерофосфорной (фосфатидной) кислоты — производной глицерина, у которого одна гидроксильная группа этерифицирована фосфорной кислотой, — и соответствующего спирта:

$$\begin{array}{l} \quad\quad\quad\quad\; CH_2OCOR_1 \\ \quad\quad\quad\quad\;\; | \\ R_2COOCH \quad\;\; OH \\ \quad\quad\quad\quad\;\; | \quad\quad\;\; | \\ \quad\quad\quad\quad\; CH_2OP{-}OH \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\;\; \| \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\;\; O \end{array} \qquad\qquad \begin{array}{l} \quad\quad\quad\quad\; CH_2OCOR_1 \\ \quad\quad\quad\quad\;\; | \\ R_2COOCH \quad\;\; OH \\ \quad\quad\quad\quad\;\; | \quad\quad\;\; | \\ \quad\quad\quad\quad\; CH_2O{-}P{-}O{-}X \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad \| \\ \quad\quad\quad\quad\quad\quad\quad O \end{array}$$

Фосфатидная кислота *Фосфоглицерид*

Примечание. R_1 и R_2 — остатки жирных кислот, X — спиртов.

Фосфатидные кислоты в клетках содержатся в очень малых количествах, они являются самыми важными промежуточными продуктами синтеза фосфолипидов и очень быстро превращаются в другие соединения.

Фосфолипиды являются структурными компонентами клетки и, входя в состав различных мембран, в том числе и цитоплазматической, играют существенную роль в характере ее проницаемости. Входящие в состав митохондрий липиды также почти целиком представлены фосфолипидами. Предполагается, что они ответственны за структуру и пространственное расположение ферментов дыхательной цепи и принимают активное участие в переносе электронов.

В состав фосфоглицеридов микроорганизмов входят в основном эфиры фосфатидной кислоты и следующих спиртов: серина (фосфатидилсерин), инозита (фосфатидилинозит), глицерина (фосфатидилглицерин). Эти производные получаются замещением атома водорода

Схема 6. Классификация липидов

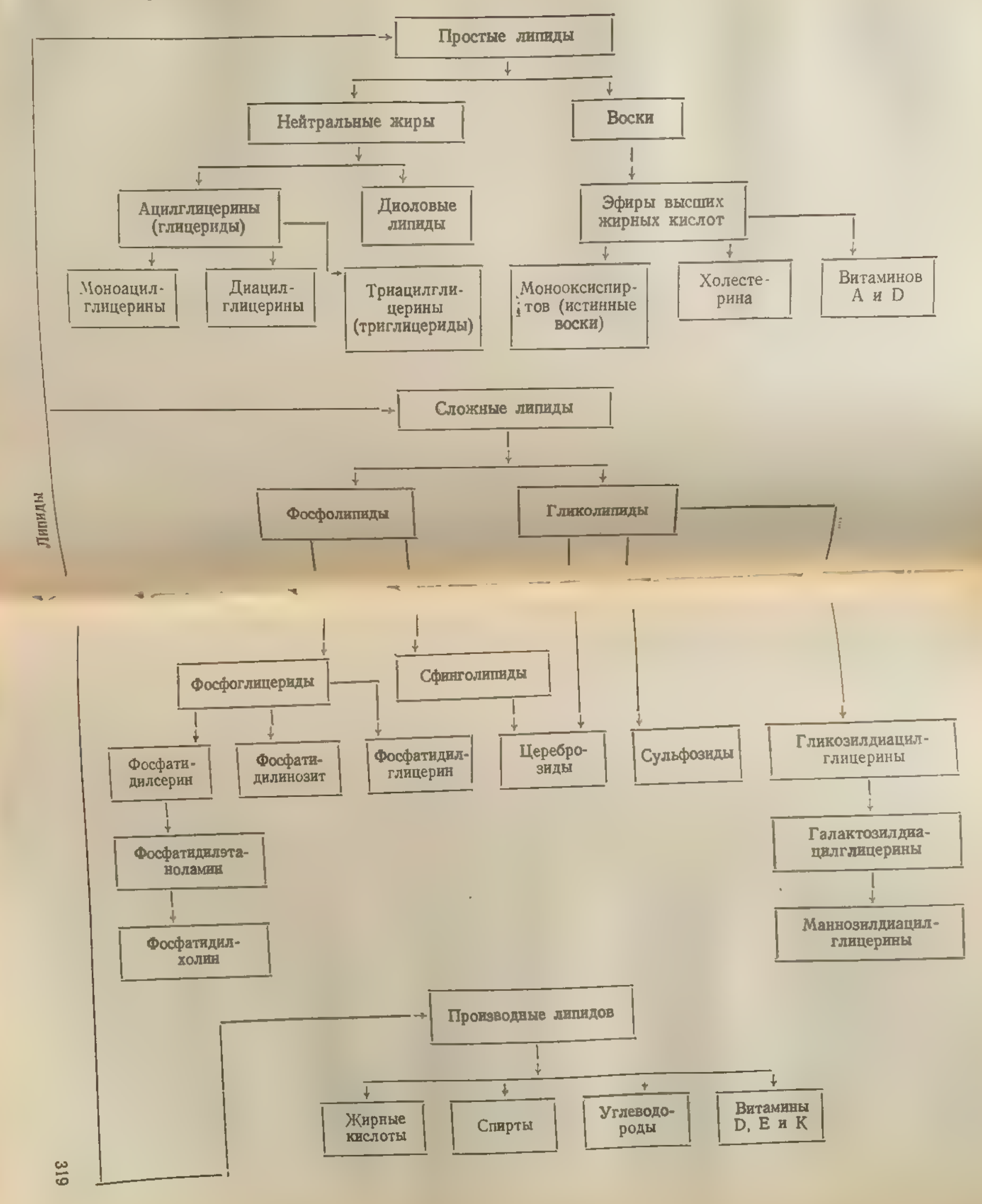
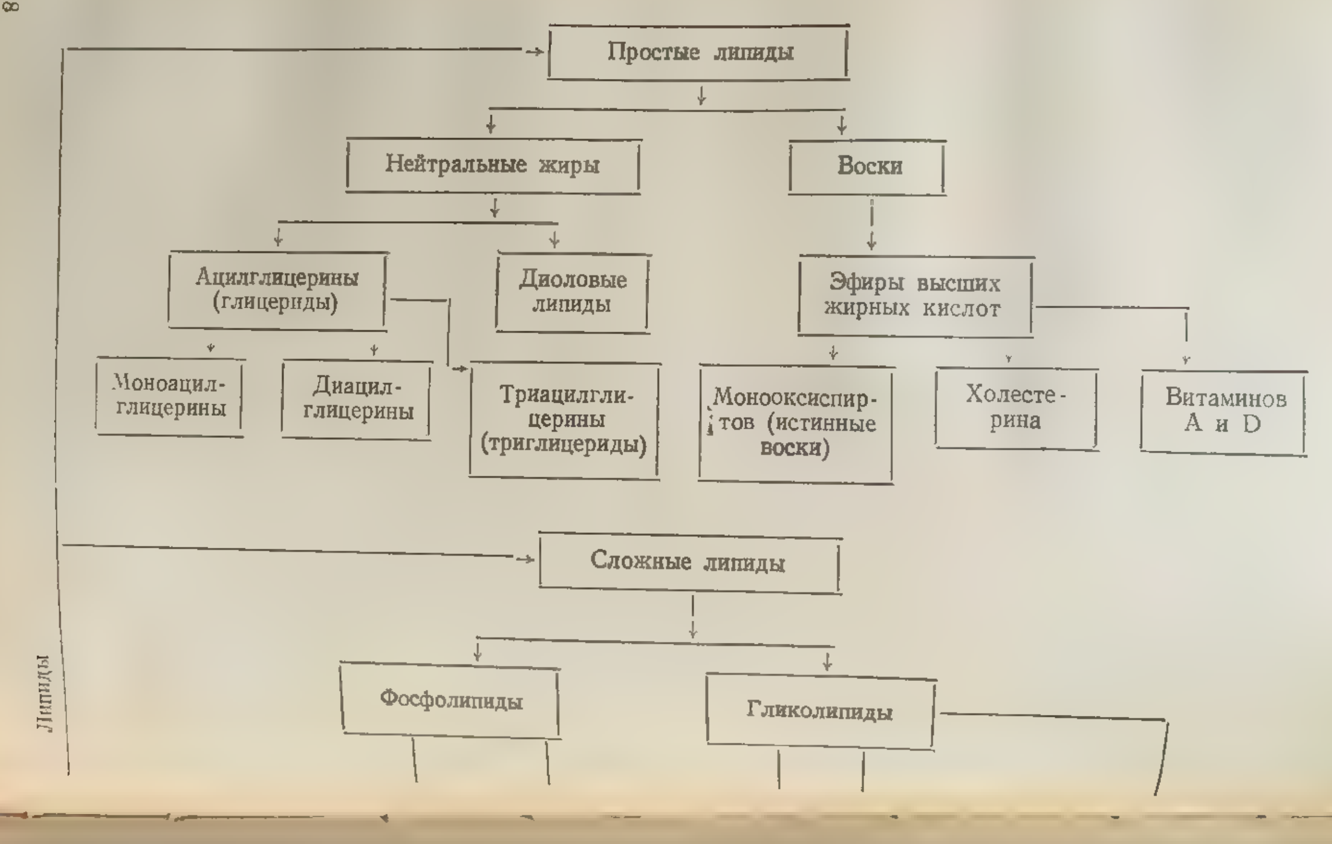
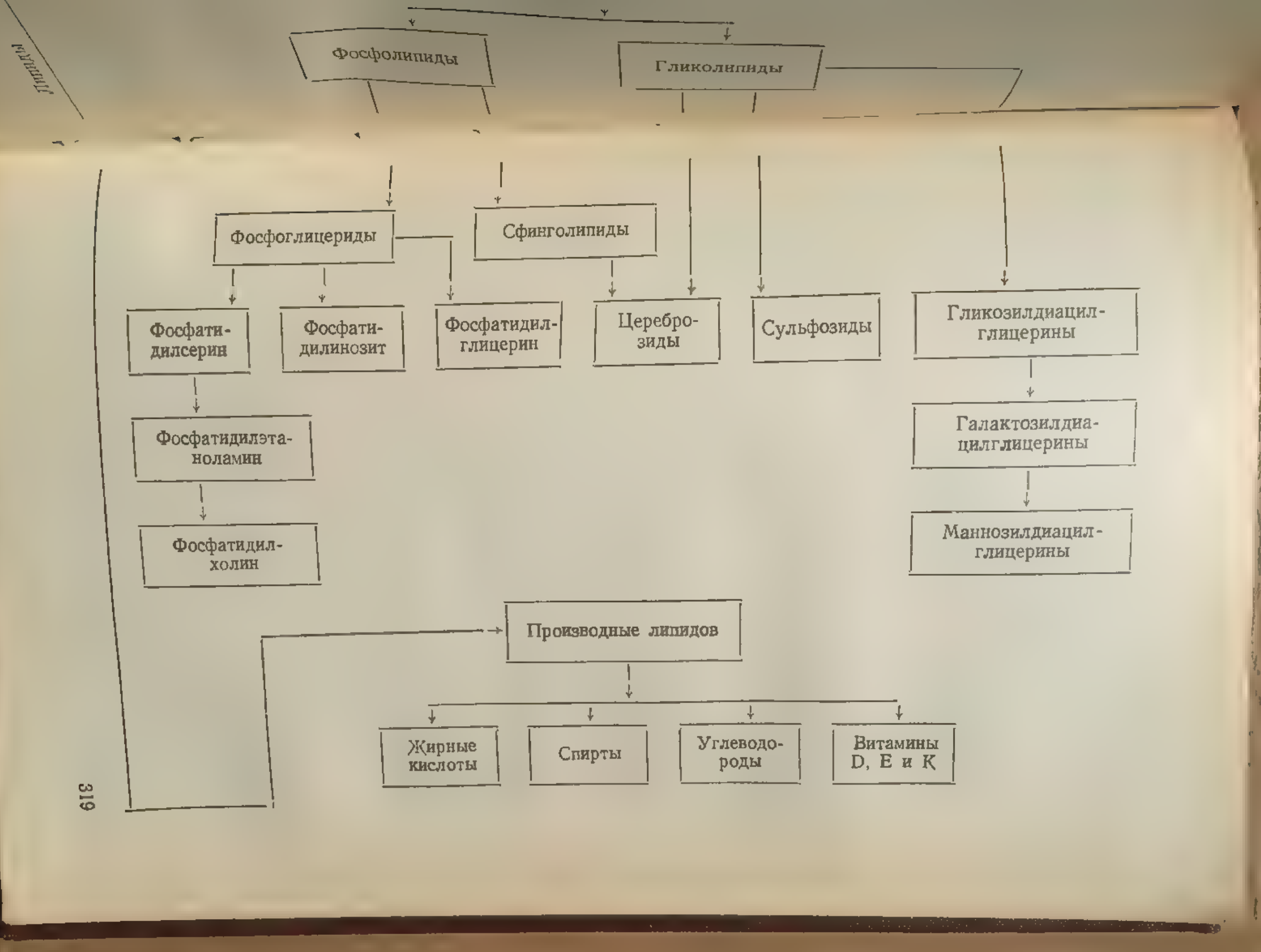


Схема 6. Классификация липидов




Фосфолипиды
Гликолипиды
Фосфоглицериды
Сфинголипиды
Фосфатидилсерин
Фосфатидилинозит
Фосфатидилглицерин
Цереброзиды
Сульфозиды
Гликозилдиацилглицерины
Фосфатидилэтаноламин
Галактозилдиацилглицерины
Фосфатидилхолин
Маннозилдиацилглицерины
Производные липидов
Жирные кислоты
Спирты
Углеводороды
Витамины D, E и K

в гидроксильной группе на соответствующий спирт. Кроме того, в составе фосфоглицеридов микроорганизмов обнаружены продукты дальнейших превращений этих соединений, например фосфатидилэтаноламин (кефалин), образуемый в результате декарбоксилирования серина в молекуле фосфатидилсерина, и фосфатидилхолин (лецитин), образуемый при переносе на остаток этаноламина в молекуле фосфатидилэтаноламина трех метильных групп (см. с. 321).

Биологические функции отдельных представителей фосфолипидов окончательно не выяснены, известно, что фосфатидилэтаноламин выполняет структурные функции, а фосфатидилсерин, предшественник фосфатидилэтаноламина, является липидным компонентом мембраны АТФ-й системы в клетках.

Фосфолипиды весьма полярны, при pH 7,0 их фосфатная группа несет отрицательный заряд. Спиртовые группы некоторых фосфоглицеридов хотя и не несут заряда, но сильно полярны, а спиртовые группы фосфатидилэтаноламина и холина при pH 7,0 несут положительный заряд.

Сфинголипиды не содержат в своей молекуле глицерина. Это производные ненасыщенных алифатических аминоспиртов с длинной цепью, сфингозина (Δ^{18}) или дигидросфингозина (Δ^{18}) и жирной кислоты, содержащие дополнительно остаток фосфорной кислоты, атом водорода в которой замещен спиртовой группой.

Остатки жирных кислот связаны с молекулой сфингозина через атом азота. Гидроксильная группа в середине алифатической цепи обычно свободна. Терминальная гидроксильная группа либо свободна (церамиды), либо этерифицирована с фосфорилхолином, давая сфингомиелин:

Пальмитиновая кислота

$$
\begin{array}{c}
CH_3(CH_2)_{14}-CO-NH \qquad\qquad\qquad O \\
| \qquad\qquad\qquad\qquad \| \\
CH_3(CH_2)_{12}-CH=CH-CH-CH-CH_2-O-P-O-CH_2CH_2N(CH_3)_3 \\
| \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad | \\
OH \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad OH
\end{array}
$$

Сфингозин · *Фосфорная кислота* · *Холин*

Неполярные хвосты · *Полярная голова*

Гликолипиды в отличие от фосфолипидов не содержат молекулу фосфорной кислоты, однако также

$$\begin{array}{ccc} & H & \\ H_2C - & C & - CH_2 \\ | & | & | \\ O & O & O \\ | & | & | \\ CO & CO & CO \end{array}$$

	R_1	R_2	R_3		*Триацилглицерины*
	R_1	R_2	(Ф)		*Фосфатидная кислота*
Фосфолипиды	R_1	R_2	(Ф)	$-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$ *Холин*	*Фосфатидилхолины (лецитины)*
	R_1	R_2	(Ф)	$-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}H_3$ *Этаноламин*	*Фосфатидилэтаноламины*
	R_1	R_2	(Ф)	$-O-CH_2-CH(COO^-)-CH_2-\overset{+}{N}H_3$ *Серин*	*Фосфатидилсерины (кефалины)*
	R_1	R_2	(Ф)	—O– (кольцо инозита: HO, OH, HO, OH, OH) *Инозит*	*Фосфатидилинозит*
	R_1	R_2	(Ф)	$-O$ (OH) (OH) $H_2C-CH-CH_2$ *Глицерин*	*Фосфатидилглицерины*
	R_1	R_2	(Ф)	$-O$ (OH) $H_2C-CH-CH_2-O-$(Ф)$-O-CH_2-CH-CH_2$ $O-CO-R_2$ (CH), $O-CO-R_1$ (H_2C)	*Дифосфатидилглицерины (кардиолипины)*

являются сильнополярными соединениями, полярный участок в молекуле которых представлен гидрофильными углеводными группами, в частности глюкозой, галактозой, маннозой и их комбинациями. Простейшими гликолипидами являются гликозилдиацилглицерины. Другая группа гликолипидов (цереброзиды) может быть отнесена также и к сфинголипидам, так как содержит остаток углевода и остаток сфингозина.

К сульфолипидам относятся эфиры цереброзидов — цереброзидсульфаты, а также сульфолипиды, содержащие глицерин, остаток жирной кислоты (олеиновой) и сульфокислоту галактозы.

К **производным липидов** относятся жирные кислоты, спирты, углеводороды, витамины D, E и K.

Жирные кислоты — наиболее изученные компоненты липидов, физические и химические свойства которых определяются их жирнокислотным составом. В липидах микроорганизмов содержатся в основном насыщенные жирные кислоты нормального строения и ненасыщенные кислоты с одной двойной связью (моноеновые) с четным числом углеродных атомов. Наиболее часто встречающимися из насыщенных кислот являются пальмитиновая и стеариновая, из ненасыщенных — олеиновая кислота, имеющая двойную связь между C_9 и C_{10} углеродными атомами, обозначаемую Δ^9:

$$CH_3(CH_2)_{14}COOH \qquad CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$$

Пальмитиновая кислота — Олеиновая кислота

Ненасыщенные жирные кислоты с двумя двойными связями (диеновые) и тремя и более двойными связями (полиеновые) в липидах микроорганизмов встречаются значительно реже, из наиболее распространенных к ним относятся линолевая $\Delta^{9,12}$ и линоленовая $\Delta^{9,12,15}$. Двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах липидов довольно часто располагаются так, что делят их на части, в которых число углеродных атомов кратно трем:

$$CH_3(CH_2)_4CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7COOH$$

Линолевая кислота

$$CH_3-CH_2CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_7COOH$$

Линоленовая кислота

Помимо компонентов микробных липидов жирные кислоты выполняют ряд самостоятельных функций, свя-

занных с регуляторным механизмом деятельности гидролизующих и синтезирующих ферментов.

Спирты, присутствующие в липидах, включают три группы соединений: спирты с прямой цепью, с β-иононовым кольцом и стерины. К первым относятся цетиловый, октадециловый и мирициловый спирты, получаемые при гидролизе восков. Производные липидов, содержащие β-иононовое кольцо, включают витамин А и каротинолы. К третьей группе относятся спирты со стерановым скелетом (стерины), растворимые только в жирорастворителях. Стерины являются одними из компонентов неомыляемой части липидов. Благодаря наличию гидроксильной группы они действуют как слабые детергенты. В дрожжах основным стерином является эргостерин.

Углеводороды, также входящие в состав неомыляемой части липидов, можно подразделить на три группы: алифатические углеводороды, каротиноиды и сквалены.

В состав липидов микроорганизмов входят жирорастворимые витамины групп D, E и K.

§ 1. МИКРООРГАНИЗМЫ — ПРОДУЦЕНТЫ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Липиды присутствуют во всех без исключения микроорганизмах, однако способностью к усиленному накоплению липидов обладают лишь немногие из них, в первую очередь дрожжи.

Дрожжи

Липидный обмен дрожжей включает потребление липидов из питательной среды, накопление резервных жиров в клетках, превращение их в процессе обмена веществ и выделение в окружающую среду. Липиды дрожжей входят в состав клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, принимают участие в регулировании клеточной проницаемости — участвуют в транспорте веществ клетки.

Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий: первая характеризуется быстрым образованием белка

в условиях обильного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (фосфоглицеринов и нейтральных жиров), вторая — прекращением роста дрожжей и усиленным накоплением липидов (в основном нейтральных липидов).

При исследовании и отборе возможных продуцентов микробных липидов рассматриваются в основном способности микроорганизмов к повышенному синтезу и накоплению в клетке отдельных фракций липидов в обычных для большинства дрожжей условиях. При этом основными требованиями, предъявляемыми к липидообразующим дрожжам, являются:

1) способность быстро расти на различных питательных субстратах, давая высокий выход биомассы;

2) расти в условиях глубинного культивирования;

3) накапливать значительное количество липидов по отношению к сухим веществам клетки;

4) осуществлять активный биосинтез липидов в обычных для культуры условиях.

Культуры дрожжей Endomyces vernalis и Oidium lactis, растущие только в условиях поверхностного культивирования, позволяют получать небольшой выход липидов — до 18—20%. Основным недостатком этих дрожжей является их неспособность к росту в глубинных условиях.

В то же время существует много штаммов дрожжей, способных накапливать значительное количество липидов при глубинном культивировании. Среди липидообразующих дрожжей присутствуют отдельные виды родов Rhodotorula, Lipomyces, Cryptococcus, Sporobolomyces, Candida и др. Из этих дрожжей наиболее широко распространены в природе дрожжи Rhodotorula, Sporobolomyces и Candida (почва, цветы, пищевые продукты, воды рек, морей и океанов); Cryptococcus и Lipomyces большей частью обнаруживаются в различных типах почв. Из этих родов дрожжей в большей или меньшей степени отвечают требованиям, предъявляемым к липидообразователям, виды Cryptococcus terricolus, Lipomyces starkeyi, L. lipoferus, Rhodotorula glutinis (gracilis), Sporobolomyces roseus. Два последних вида образуют каротиноиды.

Общим для всех этих организмов является строго окислительная ассимиляция сахаров и неспособность к брожению.

Типичными липидообразователями, полностью отвечающими требованиям, предъявляемым к ним, являются дрожжи Cryptococcus terricolus, образующие до 60% липидов. На рост и липидообразование этих дрожжей мало влияет изменение соотношения компонентов среды, в частности азота и углерода. Отличительной особенностью дрожжей Cr. terricolus является способность синтезировать липиды в любых условиях, даже в наиболее благоприятных для синтеза белка. У этой культуры блокирование ферментных систем, ответственных за синтез аминокислот, наступает на первых стадиях развития культуры, и дрожжи полностью переключаются на синтез жирных кислот и липидов. Это единственные известные типичные липидообразующие дрожжи. Все другие виды способны синтезировать значительные количества липидов, однако их липогенез зависит прежде всего от условий культивирования.

Для представителей рода Rhodotorula характерна способность к биосинтезу липидов и гликогена. Эти дрожжи при глубинном культивировании могут усваивать различные углеродсодержащие источники, в первую очередь мелассу. На отходах сахарного производства дрожжи Rhodotorula gracilis накапливают в клетках от 30 до 55% липидов при длительности выращивания от 1,5 до 2,5 сут.

Одним из недостатков дрожжей Rh. gracilis является относительно плохая усваиваемость ими ксилозы — одного из основных углеводных компонентов древесных гидролизатов. Однако опыты показали способность этих дрожжей приспосабливаться к ксилозе.

По своей липидообразующей активности дрожжи Rh. gracilis резко отличаются от других дрожжей этого рода:

Дрожжи	Накопление липидов, % по отношению к сухим веществам клеток
Rhodotorula glutinis (Rhodotorula gracilis)	30—55
rubra	6,9—13,4
aurantica	10,3
micilaginosa	10,3—24,8
sanguinea	39,5

Продолжение

flava	21,2—39,9
suganii	33,0
aurea	21,1
longissima	20,4
minuta	12,4
pallida	11,9
sanniej	19,8
Sporobolomyces	
pararoseus	31,2
roseus	30—60
Endomyces	
reesii	27,5
trumpyi	15,8
Lipomyces	
lipoferus (Torulopsis lipofera)	18,6—58,6
starkeyi	50—55
Zygolipomyces	
tetrasporus	34,2—37,8
lactosus	33,1—34,5
Trichosporon pullulans (Endomyces vernalis)	30,0—55,0
Pullularia	
pullulans	10,9—11,2
Cryptococcus	
terricolus	55—60
laurentii	13,67
diffluens	34,5
Hansenula	
ciferri	20,0
anomala	9,6—16,9
Candida	
humicola	10—30
pulcherrima	16,3
Torulopsis	
aeria	28,5
utilis	20—30
Saccharomyces cerevisiae	2,0—42,8
Пивные дрожжи	2,0—43,0

Дрожжи Lipomyces lipoferus (Torulopsis lipofera) почти не отличаются по количеству синтезируемых липидов от Rh. gracilis, выход липидов достигает 50—60% от сухой массы. Образование липидов в процессе роста этой культуры пропорционально потреблению глюкозы, стадийность процессов образования белка и накопления липидов менее всего выявлена. Эти дрожжи хорошо приспосабливаются к различным источникам углерода, способны расти и давать значительный выход липидов (до 50—55%) на промышленных сре-

дах, включающих гидролизаты торфа и древесины.

Высокое содержание липидов может быть достигнуто при культивировании дрожжей Lipomyces starkeyi, Sporobolomyces roseus и др.

Перспективным источником микробного жира в настоящее время являются дрожжи рода Candida, обычно используемые как продуценты белка. Содержание липидов у дрожжей этого рода, в частности у дрожжей

Таблица 42

Фракции липидов	Содержание (в % от общего содержания липидов) в дрожжах		
	L. starkeyi	S. roseum	C. guilliermondii
Моно- и диацилглицерины	4,6	4,8	2,5—6,0
Триацилглицерины	71,4	72,2	16,0—19,0
Стерины	2,5	3,7	1,0—1,5
Стериновые эфиры+воски	1,2	2,1	0,5—4,0
Фосфолипиды	2,2	3,3	18,0—50,0
Свободные жирные кислоты	16,4	10,1	3,5—22,0

Candida guilliermondii, относительно невысокое — 16—20% к сухой массе, однако, учитывая большие объемы производства белковых препаратов с использованием этой культуры, параллельное получение микробного жира является экономически эффективным. Кроме того, эти дрожжи отличаются богатым составом липидов, в частности высоким содержанием фосфолипидов. По данным Казанцева (ВНИИсинтезбелок), содержание фосфолипидов в дрожжах Candida guilliermondii может достигать 50% от общего содержания липидов (табл. 42). Продуценты липидов (Lipomyces starkeyi и Sporobolomyces roseus) в отличие от дрожжей C. guilliermondii накапливают значительные количества триацилглицеринов (более 70%).

Качественный анализ фосфолипидов дрожжей показал присутствие в них фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина и сфингомиелинов. Причем в дрожжах Torula преобладают фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, в пекарских дрожжах — фосфатидилхолин. Дрожжи C. guilliermondii, по данным ВНИИсинтезбелка, содер-

жат до 20% фосфатидилэтаноламина, до 27% фосфатидилхолина, до 9% фосфатидилинозита и до 2% фосфатидилсерина.

Микроорганизмы, в липидах которых наибольший удельный вес занимают триацилглицерины, имеют почти одинаковый набор жирных кислот, но соотношения этих кислот у отдельных культур различно. Так, в дрожжах рода Saccharomyces присутствуют жирные кислоты с длиной углеродной цепи от C_4 до C_{26}, при этом от 36 до 64% жирных кислот с длинной цепью составляют C_{26}. В процессе старения культур количество жирных кислот с длинной углеродной цепью увеличивается. Для дрожжей рода Rhodotorula характерно наличие C_{10}—C_{26} жирных кислот преимущественно с четным числом углеродных атомов. У рода Lipomyces в числе тривиальных жирных кислот от C_{10} до C_{18} преобладают пальмитолеиновая и олеиновая, среди кислот с длинной цепью—бегеновая C_{22} и лигноцериновая C_{24}.

Исследования жирнокислотного состава фосфолипидов Candida guilliermondii, в частности основных компонентов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, показали, что они отличаются широким набором жирных кислот C_{14}—C_{18}, отсутствием полиеновых кислот с более чем двумя двойными связями (при этом содержание ненасыщенных кислот C_{13}—C_{18} с 1—2 двойными связями составляет около 60%) относительно высоким содержанием жирных кислот с нечетным числом атомов углерода.

Микроскопические грибы

Одними из первых были изучены пенициллы и аспергиллы, содержание жира в которых составляет до 30%. В результате работы с молочной плесенью Geotrichum candidum (O. lactis) выделены штаммы, образующие до 50% липидов. При выращивании этой культуры на молочной сыворотке можно получить около 5 кг жира с 1 т. Эти же штаммы выращивали на соломе и получали на 100 т соломы 5 т жира. Однако данные культуры не способны расти в глубинных условиях.

В результате длительных исследований найдены организмы, дающие 40—50% жира (Fusarium, Rhizopus.

Mucor, Trichoderma и др.). Хорошими продуцентами липидов являются грибы Asp. phoenicus, Asp. terreus, Asp. ochraceus. Выход жиров у Asp. terreus на углеводных средах с $NaNO_3$ в качестве источника азота достигает 51%, у Asp. ochraceus на среде с мочевиной выход составляет 47,5%.

Среди других липидообразователей известны Cladiosporum fulvum, Cladiosporum herbarum, Penicillium crustosum, Pen. gladioli, Alternaria tenuis.

Состав липидов грибов представлен в основном моно-, ди- и триацилглицеринами и фосфолипидами. В небольшом количестве в грибах содержатся эфиры стеринов и углеводороды.

В процессе культивирования в первый период роста происходит накопление полярных липидов (в основном фосфолипидов) — до 80% от общего количества, в последующей фазе роста доля нейтральных липидов в общей сумме липидов микроскопических грибов увеличивается до 60%. Количественное соотношение жировых фракций грибов на средах с углеводородами зависит от длины углеродной цепи алканов. Так, культура гриба Cunninghamela elegans способна синтезировать липиды на глюкозе и *н*-алканах (C_{11}—C_{17}). При этом в присутствии *н*-алканов с короткой цепью уровень накопления липидов ниже, чем на глюкозе. С увеличением длины углеродной цепи *н*-алканов (C_{14}—C_{16}) количество липидов в клетке резко возрастает и превышает в 2—3 раза их уровень на среде с глюкозой, составляя 49% на гексадекане.

Качественные составы липидов на средах с *н*-алканами и глюкозой идентичны. Количественное соотношение фракций зависит от используемого *н*-алкана. При увеличении числа атомов углерода с 14 до 17 уменьшается содержание суммарной фракции фосфолипидов, моно-, ди- и триглицеридов (ацилглицеринов), свободных жирных кислот, увеличивается содержание фракции эфиров стеринов и углеводородов.

Фосфолипиды мицелиальных грибов представлены теми же основными группами, которые обнаруживаются у других микроорганизмов. Сравнительное изучение фосфолипидов Ceratocystis stenoceras и Sporothrix schenekii показало, что мицелий их содержит в основном кардиолипин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхо-

лин и только у одного штамма C. stenoceras обнаружен фосфатидилинозит.

Жир грибов по своему составу приближается к растительным жирам. Жирнокислотный состав микроскопических грибов представлен почти всеми кислотами — от C_{10} до C_{26} и выше. При этом их состав сильно изменяется в зависимости от состава среды и условий культивирования. Основными жирными кислотами являются $C_{18:0}$ и $C_{18:2}$.

При сравнении жирнокислотного состава мицелиальных грибов Cunninghamela elegans, Penicillium zonatum, выращенных на среде с ацетатом, пропионатом и *н*-алканами или алкенами в качестве единственных источников углерода, установлено, что на среде с ацетатом мицелий гриба содержит жирные кислоты с четным числом углеродных атомов; среди них преобладали $C_{18:1}$, $C_{18:2}$. При выращивании на среде с пропионатом повышалось содержание жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов за счет $C_{17:0}$ и $C_{17:1}$. При росте на средах с *н*-алканами синтезируются жирные кислоты, гомологичные субстрату, т. е. на среде с тетрадеканом накапливались $C_{14:0}$-кислоты (до 24%).

Бактерии

Особенность бактерий как продуцентов липидов заключена в их липидном составе. Липиды в бактериальной клетке служат прежде всего структурными элементами, участвуют в качестве биологически активных веществ в метаболических процессах и могут являться источниками энергии.

Метаболизм липидов у бактерий очень сложен, у некоторых микроорганизмов он играет ключевую роль в обмене веществ клетки. Так, изменение в составе дыхательной системы сопровождается изменениями в составе и метаболизме фосфолипидов, меняется соотношение фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина, фосфатидилдиглицерина, общее содержание фосфолипидов в клетке повышается.

Функциональное значение бактериальных липидов определяется их локализацией во внешних слоях клетки, структурной сложностью и быстрым изменением их состава во время приспособления клетки к изменившимся условиям внешней среды.

Состав липидов бактерий представлен прежде всего сложными липидами — фосфо- и гликолипидами. Нейтральные липиды составляют очень небольшую часть общего количества липидов. Фосфатидилинозиты являются основными фосфатидными компонентами сложных гликолипидов микобактерий и коринебактерий. Биологические функции их неизвестны. Фосфатидилхолины (лецитины) у большинства видов бактерий не обнаружены. Фосфатидилэтаноламины (кефалины) являются основными фосфатидными компонентами грамотрицательных бактерий, выполняют структурную функцию. Фосфатидилсерин — предшественник фосфатидилэтаноламина — является липидным компонентом мембраны АТФ-й системы в клетках.

Состав жирных кислот бактерий более разнообразен по сравнению с их составом у других микроорганизмов. В него входят жирные кислоты с числом атомов углерода от 10 до 20. Mycobacterium tuberculosis образует до 40% липидов, в составе которых найдены пальмитиновая и арахидоновая кислоты. Сложный комплекс жирных кислот содержит цитоплазматическая мембрана Lactobacillus plantarum: кроме пальмитиновой, *цис*-вакценовой, лактобациллиновой и миристоленновой в ней обнаружены небольшие количества C_{10}, C_{12}, C_{13}, C_{17} и $C_{20:2}$-кислот.

Вопрос об использовании бактерий как липидообразователей пока не стоит, но он может возникнуть при необходимости получения специфических жирных кислот.

Водоросли

Перспективы использования водорослей в качестве жирообразователей очень заманчивы, так как они не нуждаются в органическом источнике углерода для синтеза углеводов, белка и жира. На площади 500 м^2 водоросли дают за 6 мес около 100 кг жира (за то же время и на той же площади подсолнечник дает 10—24 кг, мак 20—40 и рожь 24—50 кг жира). Содержание жира в клетках водорослей составляет 40—50% по отношению к сухим веществам.

Изучение хлореллы показало, что в условиях глубинного культивирования (аэрация воздухом с 5% CO_2)

она может давать до 72—85% жира. Клетки ее под микроскопом выглядят как мешки, заполненные жиром.

Химический состав водорослей зависит от условий выращивания, и в первую очередь от количественного содержания азота в среде. Меняя это содержание, можно получать клетки с 58% белка и 5% жира или 8% белка и 85% жира.

Хлорелла может накапливать следующие количества жирных кислот (в % от массы): $C_{14:0}$ — 6; $C_{14:1}$ — 3; $C_{16:0}$ — 18; $C_{16:1}$ — 34; $C_{18:0}$ — 3; $C_{18:1}$ — 23 и $C_{20:1}$ — 13.

Недостатками водорослей как липидообразователей являются малая скорость их роста и накопление токсических соединений.

§ 2. БИОСИНТЕЗ ЛИПИДОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Основные процессы биосинтеза жирных кислот и липидов у микроорганизмов протекают теми же путями, что и у растительных, и животных организмов.

Пути биосинтеза жирных кислот и липидов

В процессе биосинтеза липидов микроорганизмами важным звеном является синтез из продуктов окисления источника углерода жирных кислот, которые затем с помощью эфирных связей включаются в состав липидов.

Полный синтез насыщенных жирных кислот с длинной цепью осуществляется в растворимой фракции цитоплазмы. Суммарная реакция синтеза жирных кислот представляет собой конденсацию одной молекулы ацетил-КоА и семи молекул малонил-КоА с образованием одной молекулы пальмитиновой кислоты (восстановление осуществляется за счет НАДФ·Н):

$$\text{Ацетил-КоА} + 7\ \text{Малонил-КоА} + 14\ \text{НАДФ·Н}^+ + 14\ \text{Н}^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow CH_3(CH_2)_{14}COOH + 7\ CO_2 + 8\text{КоА} + 14\ \text{НАДФ}^+ + 6H_2O.$$

Единственная молекула ацетил-КоА в этой реакции служит «затравкой», или инициатором. Рост цепи при синтезе жирной кислоты начинается с карбоксильной группы ацетил-КоА и происходит путем последовательного добавления ацетильных остатков к карбоксильному концу растущей цепи. При этом важную роль играет особый белок, так называемый ацилпереносящий

(АПБ). Этот белок является акцептором, на который последовательно переносятся двухуглеродные фрагменты (C_2), образуя за счет эфирных связей комплексы $CH_3 - CO - S - АПБ$. Донором C_2-фрагментов является малонил-КоА.

АПБ–SH + CH_3-CO-КоА → (2) → $CH_3-CO-S-$АПБ + КоА–SH

CH_3-CO-КоА + CO_2 (АТФ → АДФ) → (1) → $HOOC-CH_2-CO-S-$КоА

АПБ–SH + $HOOC-CH_2-CO-S-$КоА → (3) → $HOOC-CH_2-CO-S-$АПБ + КоА–SH

$CH_3-CO-S-$АПБ + $HOOC-CH_2-CO-S-$АПБ → (4) → CO_2, АПБ–SH

$CH_3-CO-CH_2-CO-S-$АПБ

Ацетоацетил — S–АПБ

↓ (5) НАДФ·H^+ → $НАДФ^+$

$CH_3CHOH-CH_2-CO-S-$АПБ

Оксибутирил — S–АПБ

↓ (6) $-H_2O$

$CH_3CH{=}CH-CO-S-$АПБ

Кротонил–S–АПБ

↓ (7) НАДФ·H^+ → $НАДФ^+$

$CH_3-CH_2CH_2-CO-S-$АПБ

Бутирил — S–АПБ

↓

Малонил–S–АПБ → *Гексаноил*–S–АПБ

При переносе с помощью АПБ C_2-фрагмента к уже имеющейся цепи углеродных атомов освобождается CO_2 и регенерируется свободный АПБ. В результате переноса C_2-фрагмента на конце продукта оказывается ацетильная группа, которая в ходе последующих реакций восстанавливается, дегидрируется и снова восстанавливается. В итоге получается комплекс АПБ с ненасыщенным ацильным остатком, содержащим два дополнительных атома углерода. Далее реакции с 4 по 7 повторяются и цепь удлиняется каждый раз на 2 углеродных атома.

Свободная карбоксильная группа каждого нового остатка малонил-КоА замещается на карбоксил растущей цепи ацетил-КоА. Малонил-КоА, непосредственный предшественник пальмитиновой кислоты, образуется из цитоплазматического ацетил-КоА и CO_2 по реакции

$$\underset{\text{Ацетил-КоА}}{CH_3{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}S{-}KoA} + CO_2 + АТФ \xrightarrow{Mn^{2+}} \underset{\text{Малонил-КоА}}{HOOC{-}CH_2{-}\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}{-}S{-}KoA} + АДФ + Ф_н$$

Предшественником цитоплазматического ацетил-КоА является внутримитохондриальный ацетил-КоА, который образуется в результате окислительного декарбоксилирования пирувата и β-окисления жирных кислот с длинной цепью.

Мононенасыщенные жирные кислоты образуются у различных бактерий с помощью одного из двух путей: аэробного (*Mycobacterium* sp., *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, грибы, простейшие, животные) или анаэробного (*Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *E. coli*, *Pseudomonas* sp., фотосинтезирующие бактерии, цианобактерии). Второй путь встречается как у анаэробов, так и у аэробов.

Аэробный путь заключается в дальнейшей перестройке насыщенных жирных кислот при обязательном участии кислорода.

Синтез мононенасыщенных жирных кислот, например пальмитоолеиновой, по анаэробному пути у таких мик-

роорганизмов, как E. coli, начинается с дегидратации β-оксидекановой кислоты. Затем к карбоксильному концу ненасыщенного ацильного C_{12}-производного добавляются 3 двухуглеродных единицы в форме малонил-КоА и образуется эфир АПБ пальмитоолеиновой кислоты.

Синтез триацилглицеринов (нейтральных жиров) происходит на основе двух предшественников: *L*-глицерил-3-фосфата и КоА — производного жирной кислоты. *L*-Глицерилфосфат образуется из двух различных источников: диоксиацетонфосфата, получающегося в результате реакций дыхательного цикла

$$\text{\textit{Диоксиацетонфосфат}} + \text{НАД}\cdot\text{Н} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{\textit{L-глицерил-3-фосфат}} + \text{НАД}^+,$$

и при действии глицеролкиназы

$$\text{АТФ} + \text{\textit{Глицерин}} \longrightarrow \text{\textit{L-глицерил-3-фосфат}} + \text{АДФ}.$$

Собственно синтез триацилглицеринов осуществляется в несколько этапов. На первой стадии происходит ацилирование свободных гидроксильных групп глицерофосфата двумя молекулами КоА — производного жирной кислоты — и образование *L*-фосфатидной кислоты. В этой реакции участвуют насыщенные и ненасыщенные C_{16} и C_{18} производные КоА. На второй стадии от фосфатидной кислоты отщепляется неорганический фосфат и образуется диацилглицерин. На третьей стадии диацилглицерин ацилируется с образованием триацилглицерина:

$$\underset{\text{\textit{Глицерофосфат}}}{\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2{-}O{-}PO_3H_2 \end{array}} \xrightarrow[\text{\textit{КоА-производное жирной кислоты}}]{2R{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}S{-}КоА} \underset{\text{\textit{L-фосфатидная кислота}}}{\begin{array}{l} H_2C{-}O{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R \\ | \\ HC{-}O{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R \\ | \\ H_2COPO_3H_2 \end{array}} + 2КоА{-}SH \longrightarrow$$

$$\xrightarrow{\text{\textit{Фосфатаза}}} \underset{\text{\textit{Диацилглицерин}}}{\begin{array}{l} H_2C{-}O{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R \\ | \\ HC{-}O{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R' \\ | \\ CH_2OH \end{array}} \xrightarrow{R''{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}S{-}КоА} \underset{\text{\textit{Триацилглицерин}}}{\begin{array}{l} H_2CO{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R \\ | \\ HCO{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R' \\ | \\ H_2CO{-}\underset{\underset{O}{\|}}{C}{-}R'' \end{array}}$$

Фосфатидные кислоты присутствуют в клетках в следовых количествах, однако они являются важными промежуточными продуктами, общими для биосинтеза триацилглицеринов и фосфоглицеридов. В процессе биосинтеза фосфоглицеридов *L*-фосфатидная кислота, вступая в обратимую реакцию с цитидинтрифосфатом, превращается в цитидинфосфатдиацилглицерин, который служит общим предшественником всех фосфоглицеридов, образующихся по этому пути (I) (см. с. 337).

Молекула цитидиндифосфатдиацилглицерина (ее цитидиндифосфатная часть) служит переносчиком фосфатидной кислоты. В последующих реакциях, каждая из которых катализируется специфичным ферментом, цитидинмонофосфат вытесняется из молекулы одним из двух спиртов: инозитом (5) или глицерофосфатом (6) — с образованием соответственно фосфатидилинозита или 3-фосфатидилглицерол-1-фосфата.

По другому пути (II) через диацилглицерин реакциями с ЦДФ замещением холина, этаноламина и серина образуются соответственно фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин.

Особенности состава питательной среды и условий культивирования микроорганизмов — продуцентов липидов

Состав питательной среды. Источниками углерода и энергии для микроорганизмов — продуцентов липидов — при направленном культивировании с целью получения микробного жира могут быть углеводы, карбоновые и жирные кислоты, углеводороды, спирты. Поэтому для получения микробных липидов используется то же питательное сырье, что и для производства кормового белка: гидролизаты растительных отходов, древесины, торфа, отходы пищевой промышленности, послеспиртовая барда, молочная сыворотка, продукты нефтеперерабатывающей промышленности — *н*-парафины и нефтяные дистилляты.

Особенно легко липидообразующие микроорганизмы ассимилируют моносахариды — глюкозу, фруктозу и маннозу, затем ди-, три- и полисахариды, ценность которых понижается с увеличением степени полимеризации. От ценности источника углеродного питания и энергии

$R-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-SKoA$ ① $HS-KoA$

H_2C-OH
$HC-OH$
$H_2C-O-Ф$
Глицерин 3 фосфат

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O\ Ф$
Фосфатидная кислота

② H_2O → Ф

① ЦТФ → ФФ

II $H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
H_2C-OH
Диацилглицерин

$R_3-C(=O)-SKoA$ → ③ $HS-KoA$

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-C(=O)-R_3$
Триацилглицерин

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-ЦДФ$
ЦДФ-диацилглицерин

I → ЦМФ + Ф

ЦДФ-холин → ЦМФ

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-Ф-O-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3$
Фосфатидилхолин

Инозит → ⑤ ЦМФ

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-Ф-O$ (OH, OH, HO, OH, HO)
Фосфатидил инозит

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-Ф-O\ OH\ OH$
$H_2C-\underset{H}{C}-CH_2$
Фосфатидил глицерин

⑦ ЦДФ-этаноламин → ЦМФ

3(S-аденозил-гомоцистеин)
3(S-аденозил-метионин)

⑧ $H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-Ф-O-CH_2-CH_2-NH_3^+$

Серин, Этаноламин ⑨ CO_2

$H_2C-O-C(=O)-R_1$
$HC-O-C(=O)-R_2$
$H_2C-O-Ф-O-CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$
Фосфатидилсерин

ЦМФ ⑥

$H_2C-O-C(=O)-R_1$ $R_1-C(=O)-O-CH_2$
$HC-O-C(=O)-R_2$ $R_2-C(=O)-O-CH$
$H_2C-O-Ф-O\ OH\ O-Ф-O-CH_2$
$H_2C-\underset{H}{C}-CH_2$
Дифосфатидилглицерин

во многом зависят выход дрожжей, количество и состав синтезируемых липидов. Источник углерода в сильной степени влияет на биосинтез ненасыщенных жирных кислот: общая ненасыщенность липидов при использовании пентозных сахаров и спирта повышается.

Источники углерода влияют и на процессы образования нейтральных липидов. При использовании в качестве единственного источника углерода спиртов (маннит или глицерин) у дрожжей Lipomyces starkeyi процессы синтеза свободных жирных кислот и фосфоглицериды превалируют над процессом синтеза триацилглицеринов. Наибольший удельный вес в таких липидах падает на долю свободных жирных кислот.

Особое влияние на биосинтез микроорганизмами липидов оказывают углеродсодержащие соединения, которые сами являются компонентами липидов. Использование в качестве источника углерода некоторых жирных кислот резко увеличивает содержание именно этих кислот в микробных липидах. Например, введение в питательную среду линолевой кислоты позволяет увеличить ее содержание в дрожжевых липидах более чем в 12 раз, пальмитиновой — на 48%, олеиновой — на 46% и т. д. Это объясняется тем, что микроорганизмы используют жирные кислоты в качестве продуктов синтеза липидов без предварительного их карбоксилирования, при этом энергетические затраты на синтез липидов сводятся к минимуму.

Применение в качестве источника углерода углеводородов ведет к значительному изменению жирнокислотного состава липидов. В этом случае синтезируемые жирные кислоты клеток либо имеют длину, равную длине цепи использованного алкана, либо на четное число углеродных атомов больше длины углеродной цепи молекулы исходного алкана. При использовании для выращивания микроорганизмов углеводородов с нечетным числом углеродных атомов в составе дрожжевых липидов появляется большое количество жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов. Количество их возрастает с уменьшением длины цепи используемого алкана. Среди высших жирных кислот микроорганизмов, выращиваемых на углеводородах, преобладают пальмитиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая.

Источники азота не являются основой для биосинтеза липидов, а только принимают участие в конструктивном обмене клетки, поэтому их влияние на биосинтез липидов носит косвенный характер. Это связано с неодинаковой усваиваемостью микроорганизмами различных азотсодержащих соединений.

При использовании трудноусваиваемых источников азота возрастают энергетические потребности микроорганизма, на которые расходуется повышенное количество источника углерода. Поэтому для обеспечения направленного биосинтеза липидов микроорганизмами используются легкоассимилируемые источники азота, к числу которых можно отнести некоторые органические соединения, особенно аспарагин и мочевину. Высокая эффективность усвоения мочевины в качестве источника азота связана с ее физиологической нейтральностью.

Сравнивая влияние неорганических соединений, азотных и аммонийных солей на скорость накопления биомассы, необходимо отметить, что более окисленный источник азота способствует перераспределению фракций липидов, вызывая увеличение уровня триацилглицеринов и частичную замену $C_{18:2}$-кислоты насыщенной кислотой.

На синтез липидов микроорганизмами оказывает влияние соотношение углерода и азота в питательной среде, которое определяет направление биосинтеза в сторону образования белка либо липидов. Сдвиг этого соотношения в сторону повышения концентрации азота вызывает резкое снижение липидообразования у микроорганизмов, а недостаток азота при обеспеченности углеводами ведет к понижению выхода сухих веществ и к высокому процентному содержанию жира. Избыток азота при недостатке углеводов влечет за собой понижение выхода сухих веществ при одновременном (но незначительном) накоплении липидов.

Оптимальное для максимального липидообразования соотношение азотного и углеродного питания зависит от используемых источников углерода и азота, а также от вида микроорганизмов. Например, на средах с глюкозой и глюкозосодержащими продуктами оптимальное соотношение N : C для дрожжей Rh. gracilis составляет 1 : 76 и 1 : 78, на средах с сахарозой — 1 : 60. При выращивании Rh. gracilis на среде с ксилозой и глицерином это

соотношение находится в пределах 1 : 40÷50. Использование углеводородов в качестве источника углерода для выращивания дрожжей Candida требует установления соотношения азота и углерода в пределах 1 : 30. Оптимальное соотношение N : C тем меньше, чем труднодоступнее источник углерода для микроорганизма.

Помимо источников углерода и азота на рост микроорганизмов и скорость процессов липидообразования определенное влияние оказывают источники минерального питания, а также биологические факторы, среди которых основная роль отводится витаминам, провитаминам и их производным.

Из безазотистых минеральных солей на рост микроорганизмов и накопление липидов наиболее сильное влияние оказывают фосфаты. Установлено, что нормальное накопление липидов возможно только при наличии в среде определенных доз усваиваемого фосфора. Недостаток фосфора приводит к неполному использованию источника углерода среды, а его избыток изменяет направление процесса в сторону накопления нелипидной фракции. Такое действие солей фосфора объясняется участием их в метаболических процессах микробной клетки. Недостаток фосфора в среде влияет на процессы, связанные с ассимиляцией углеводов, с одной стороны, и с синтезом белка — с другой. Избыточное снабжение фосфором ведет к повышенному синтезу белка, а недостаток фосфора в среде усиливает липидообразование. Таким образом, влияние фосфора аналогично действию азота. На состав синтезируемых липидов фосфор практически не оказывает влияния.

Влияние ионов Mg, K и Na сказывается прежде всего на интенсивности использования источников углерода, на скорости роста дрожжей и, как следствие, на количестве синтезируемых липидов. Состав липидов не зависит от содержания ионов Mg, K и Na в среде.

Большинство липидообразующих дрожжей сами являются прототрофами, т. е. продуцентами отдельных витаминов, они могут развиваться на средах, почти не содержащих этих соединений. Однако введение в среду некоторых витаминов может оказывать положительное влияние на липогенез и состав липидов. Установлено, что отсутствие пантотеновой кислоты у дрожжей Rh. gracilis отрицательно влияет не только на синтез

общих липидов, но и на образование эргостерина. Влияние пантотеновой кислоты на биосинтез липидов дрожжами связано с тем, что пантотеин (производное пантотеновой кислоты и цистеина) входит в состав КоА, который участвует в синтезе высших жирных кислот и стероидов. Частично обеспечить потребность дрожжевых клеток в пантотеновой кислоте можно введением в среду β-аланина, который является составной частью пантотеновой кислоты.

Наличие в среде тиамина при недостатке парааминобензойной кислоты вызывает нарушение синтеза серина и метионина. Отсутствие этих аминокислот ведет к нарушениям в синтезе фосфоглицеридов, что в свою очередь оказывает влияние на общий метаболизм липидов.

На процессы, связанные с синтезом фосфоглицеридов, большое влияние оказывает также инозит — шестиатомный спирт, производное циклогексана. Уменьшение содержания в среде инозита приводит к изменениям в структуре клеточной оболочки (хрупкость), что связано с нарушениями в метаболизме липидов и снижением относительного содержания фосфоглицеридов.

Влияние на рост и липидообразование микроорганизмов других витаминов и ростовых веществ изучено недостаточно. Однако выяснено, что на различные организмы они действуют неодинаково, что связано прежде всего со способностью микроорганизмов к их синтезу.

Рассмотренные факторы оказывают в основном влияние на липогенез микроорганизмов, не являющихся истинными липидообразователями (Saccharomyces, Candida). Что касается дрожжей Lipomyces, то они мало нуждаются в дополнительных факторах роста.

Условия культивирования. В процессе выращивания микроорганизмов, продуцирующих липиды, для окисления компонентов питательной среды и высвобождения необходимой для биосинтеза клетки энергии необходим кислород, который играет роль акцептора при связывании четырех пар атомов водорода, высвобождающихся при образовании промежуточных продуктов распада углеводов (цикл трикарбоновых кислот) в процессе дыхания.

Непосредственного влияния кислорода на процессы липидообразования точно не установлено. Предполага-

ется, что кислород, тормозя липолитическое действие липазы, способствует биосинтезу липидов.

Кроме того, в присутствии достаточного количества кислорода в среде микроорганизмы могут синтезировать липиды за счет ацетата и этилового спирта, присутствующих в среде. Недостаток кислорода приводит к образованию липидов за счет резервных углеводов клетки.

Выращивание микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях оказывает влияние на соотношение липидных фракций. В анаэробных условиях образуются главным образом предшественники эргостерина, в частности сквален, а перевод микроорганизмов в аэробные условия вызывает ускоренный синтез стеринов и жирных кислот.

Изменение интенсивности аэрации среды сказывается прежде всего на таких фракциях, как фосфоглицериды, свободные жирные кислоты и триацилглицериды. Липиды микроорганизмов, выращенных при малом доступе O_2, содержат почти в 2 раза больше фосфоглицеридов, в 8 раз больше свободных жирных кислот и в 4 раза меньше триацилглицеринов, чем липиды микроорганизмов, выращенных в условиях оптимального снабжения их кислородом. Недостаток O_2 ведет к резкому торможению процессов синтеза триацилглицеринов, к образованию нетипичных для организма липидов. Высокое относительное содержание фосфоглицеридов при недостаточном снабжении культуры O_2 связано с функциональными свойствами этих компонентов, ответственных за дыхание.

Содержание ненасыщенных жирных кислот в липидах микроорганизмов в период максимального их образования зависит от скорости растворения кислорода в среде. С интенсификацией аэрации среды возрастает степень ненасыщенности синтезируемых липидов и увеличивается относительное количество всех групп ненасыщенных кислот.

Скорость роста микроорганизмов и липидообразование зависят от величины pH среды (табл. 43). Изменение pH в ту или другую сторону от оптимального влечет за собой большие изменения в составе и незначительные — в количестве суммарных липидов. При исследовании липидообразования дрожжей Rhodotorula glutinis 35 установлено, что увеличение pH от 2,5—3 до

Таблица 43

pH	S. roseus			L. starkeyi		
	биомасса, г/л	липиды, г на 100 г сахара	белок, %	биомасса, г/л	липиды, г на 100 г сахара	белок, %
3,0	1,3	0,7	20,0	1,8	1,2	21,2
4,0	7,3	6,4	20,0	12,2	17,0	20,6
5,0	10,3	10,8	20,0	13,9	17,2	21,9
6,0	11,5	12,0	22,5	14,3	15,0	22,9
7,0	12,5	12,8	21,2	13,2	14,2	19,4
8,0	11,5	13,3	22,5	10,9	12,5	18,1
9,0	7,0	8,5	10,0	18,7	8,8	21,9

8,0—8,5 не приводит к заметным изменениям количества липидов в дрожжах, в то время как жирнокислотный состав липидов перестраивается, наблюдается значительное увеличение доли линолевой кислоты. У дрожжей C. guilliermondii и C. lipolytica изменение кислотности в интервале от 2,5—3 до 6,0—7,0 практически не влияет на выход биомассы и липидов. Однако сдвиг pH в щелочную сторону от оптимума вызывает резкое увеличение содержания фосфоглицеридной фракции, свободных жирных кислот и снижение содержания триацилглицеринов. При понижении pH с 6,0 до 3,0 повышается процентное содержание миристиновой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой, линолевой и линоленовой кислот, а уменьшается — олеиновой.

Среднее соотношение между содержанием ненасыщенных и насыщенных жирных кислот снижается от 3,54 при pH 6,0 до 2,74 при pH 3,0, полиненасыщенных кислот — повышается от 26 до 39%.

Для большинства микроорганизмов с понижением температуры наблюдается тенденция к ускорению синтеза липидов с повышенной степенью ненасыщенности

Таблица 44

Температура культивирования, °C	L. starkeyi			Sporobolomyces roseus		
	липиды		биомасса, г/л	липиды		биомасса, г/л
	г/л	%		г/л	%	
22	5,2	47,1	11,0	2,8	26,5	10,5
27	5,1	49,0	10,5	4,6	40,0	11,6
32	6,4	59,1	10,9	5,7	52,9	10,8

кислот. При этом оптимальные температуры роста и липидообразования совпадают (табл. 44). Понижение или повышение температуры приводит к снижению содержания фосфоглицеридной фракции с одновременным увеличением содержания фракции триацилглицеринов. Общее содержание липидов мало зависит от температуры культивирования. Считается, что изменение температуры выращивания оказывает влияние главным образом на скорость роста и накопление биомассы, в меньшей степени влияя на процентное соотношение липидов в клетке. Как следствие снижения выхода биомассы наблюдается снижение общего выхода липидов на единицу используемых редуцирующих веществ.

Соотношение накапливаемых микроорганизмом жирных кислот (насыщенных и ненасыщенных) прямо зависит от температуры выращивания. Изменением температурного режима можно регулировать жирнокислотный состав фосфоглицеридной фракции, создавая оптимальные соотношения насыщенных и ненасыщенных кислот фосфолипидных мембран.

Известно большое взаимное влияние температуры культивирования и pH среды: если понижение температуры культивирования ведет к увеличению общей ненасыщенности синтезируемых липидов, то снижение pH среды повышает их насыщенность. Оказывая определенное воздействие на ферменты синтеза липидов, оба эти фактора позволяют в известной степени управлять биосинтетическими процессами в микробной клетке.

Внеклеточные липиды дрожжей

Наряду с внутриклеточными у некоторых видов дрожжей были обнаружены и внеклеточные липиды. Большинство организмов, обладающих способностью к выделению или экстракции липидов, было изолировано из филосферы тропических растений. Среди дрожжей, синтезирующих внеклеточные липиды, имеются представители родов Hansenula, Sporobolomyces, Cryptococcus, Torulopsis, Candida и Rhodotorula.

Исследования состава внеклеточных липидов показали, что микроорганизмы выделяют соединения, которые с точки зрения химической структуры можно подразделить на 4 основные группы: сфинголипиды, полиоловые

эфиры жирных кислот, софорозиды оксикислот и C_{22}-кислоты.

Сфинголипиды. Небольшие количества этих соединений (особенно цереброзидов) были обнаружены во внутриклеточных липидах, но во внеклеточных они занимают значительно больший удельный вес.

Полиоловые эфиры жирных кислот. Исследования полиоловых эфиров позволили установить наличие пента- и гексаспиртов, составляющих до 20—30% от массы липидов. Жирные кислоты эфиров представлены уксусной, миристиновой, пальмитиновой и другими кислотами. Обнаруженная в составе экзолипидов уксусная кислота, являющаяся основным предшественником в биосинтезе жирных кислот, позволяет предположить, что эфиры полиолов экстрацеллюлярных липидов образуются на первых этапах биосинтеза липидов дрожжевой клеткой.

Софорозиды оксикислот. Эти вещества представляют собой соединения, в которых гидроксильная группа жирных кислот гликозидно связана с углеводом (софороз). Соединения такого типа образуются различными дрожжами. Среди экзолипидов обнаружены 2 типа софорозидов: твердые, имеющие форму кристаллов, и жидкие.

C_{22}-кислоты. Эти вещества представляют собой ацетилированные 3-гидрокси- и дигидрооксижирные кислоты. Жирнокислотный состав внеклеточных липидов дрожжей в основном не отличается от внутриклеточных, однако соотношение жирных кислот в них различно. В экзолипидах значительно больше линолевой и линоленовой и меньше пальмитиновой, стеариновой, олеиновой кислот. В экзолипидах имеется значительное количество C_{22}-оксикислот, что является их специфической особенностью.

Если сравнить фракционный состав липидов, то можно заметить отсутствие в экзолипидах фракции триглицеридов. В то же время около 50% всех липидов у них падает на долю фосфолипидов. Налицо, таким образом, резкое различие между обоими типами липидов, что является свидетельством их различного происхождения.

Внеклеточные липиды образуются исключительно молодыми дрожжевыми клетками. Динамика их образования идентична образованию интрацеллюлярных липидов. После использования источников углеродного питания в среде количество экзолипидов постепенно

уменьшается, что является свидетельством потребления их дрожжевой клеткой. Все дрожжи, обладающие способностью выделять липиды, обладают и заметной внеклеточной липазной активностью.

Причина и место биосинтеза внеклеточных липидов до настоящего времени остаются невыясненными. Можно предположить, что внеклеточные липиды первоначально образуются в клетках дрожжей, а затем выделяются в среду. Действительно, в внутриклеточных липидах некоторых штаммов дрожжей Rhodotorula удалось обнаружить отдельные оксикислоты, этерифицированные C_5 и C_6-полиолами, т. е. те группы липидов, которые обычно имеются в составе внеклеточных липидов. Наличие одинаковых полиолов во внутри- и внеклеточных липидах может свидетельствовать о том, что они образуются в клетках, а затем без изменения структуры переходят в среду. Однако в составе внутриклеточных липидов нет структурных форм, обнаруживаемых во внеклеточных липидах.

На количество и состав выделяемых в среду липидов определенное влияние оказывают условия питания и культивирования микроорганизмов. При использовании в качестве источника углерода C_5 и C_6-полиолов дрожжи образуют в 3 раза больше внеклеточных липидов, чем на среде с глюкозой. Подобное явление объясняется тем, что при ассимиляции C_5 и C_6-полиспиртов клетка затрачивает значительно меньше энергии на биосинтез специфичных экзолипидов, чем при использовании глюкозы, которая в конечном итоге превращается в те же полиолы.

Снижение концентрации азота в среде ведет к интенсификации процессов выделения липидов, при этом определенное значение имеет и сама природа источника азота. Повышение степени аэрации среды способствует повышению в среде количества экзолипидов.

Специфичным является воздействие на дрожжи, выделяющие липиды, таких факторов, как температура культивирования и pH среды. Снижение температуры способствует тому, что дрожжи постепенно теряют способность к экскреции липидов, но зато начинают выделять значительные количества внеклеточных полисахаридов. Аналогично действует и снижение активной кислотности среды. Подобное явление свидетельствует о большой взаимосвязи процессов биосинтеза внеклеточных липидов и полисахаридов, которые образуются из одних и тех же предшественников.

Сравнительно недавно обнаруженное явление экскреции липидов некоторыми видами дрожжей имеет боль-

шое значение для развития микробиологического способа получения липидов, так как выделение внеклеточных липидов из среды не представляет трудностей и, кроме того, сам процесс получения таких липидов более экономичен.

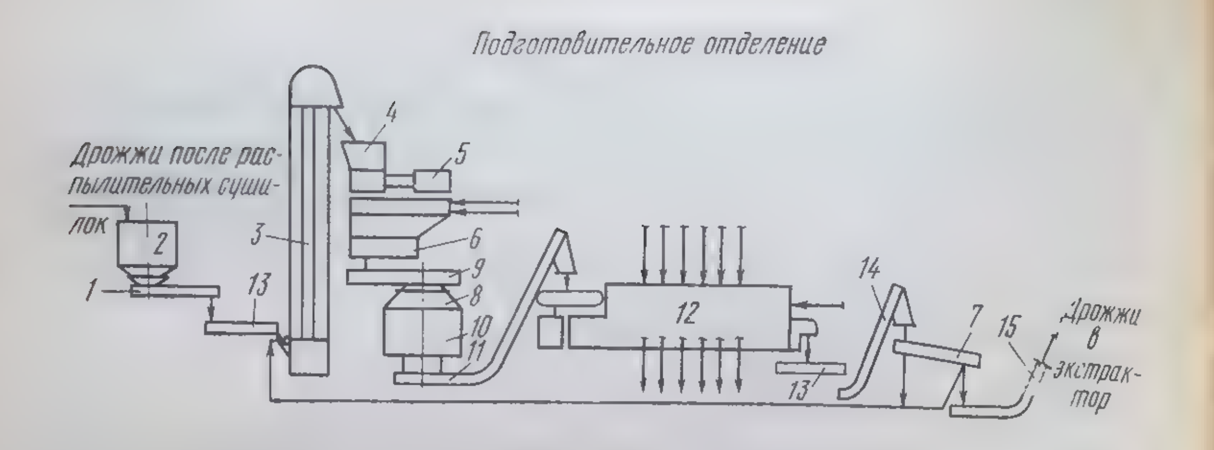
§ 3. АППАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ

На рис. 104 представлена технологическая схема получения микробных липидов, включающая подготовительное и экстракционное отделения.

В подготовительном отделении сухой препарат клеточной биомассы после распылительной сушилки поступает в приемный бункер *2*, откуда через весы *1* и конвейер *13* элеватором-норией *3* передается в кондиционер *5* для увлажнения. Влажная биомасса продавливается через фильеры гранулятора *6* и конвейером *9* передается на вальцы. На вальцах гранулы измельчаются до определенных размеров и далее элеватором *11* подаются на сушилку *12*. Высушенные частицы биомассы элеватором *15* через сито *7* для отделения тонкой фракции подаются на элеватор экстрактора и оттуда через конвейер *17* — в экстрактор *18*.

Экстракционное отделение включает оборудование для проведения собственно процесса экстракции и выделения липидов из биомассы, при этом параллельно получаются 2 продукта: обезжиренная микробная биомасса (обезжиренный белковый препарат) и микробный жир. В экстракторах различных конструкций под действием растворителей происходит выделение липидов из клеточной биомассы. Обезжиренная биомасса через разгрузочную мешалку экстрактора и конвейер поступает в десольвентор *23*, в который по всей высоте подается острый пар. Под действием пара и высокой температуры происходит удаление из биомассы остатков растворителя, пары которого улавливаются и собираются в паровом скруббере *26*. Освобожденная от растворителя и частично подсушенная биомасса транспортером разгрузки десольвентора передается на грануляцию и фасовку.

Концентрированная мисцелла (раствор биожира в растворителе) из экстрактора поступает в сборник *29*, откуда насосом *30* через подогреватель мисцеллы *32* —



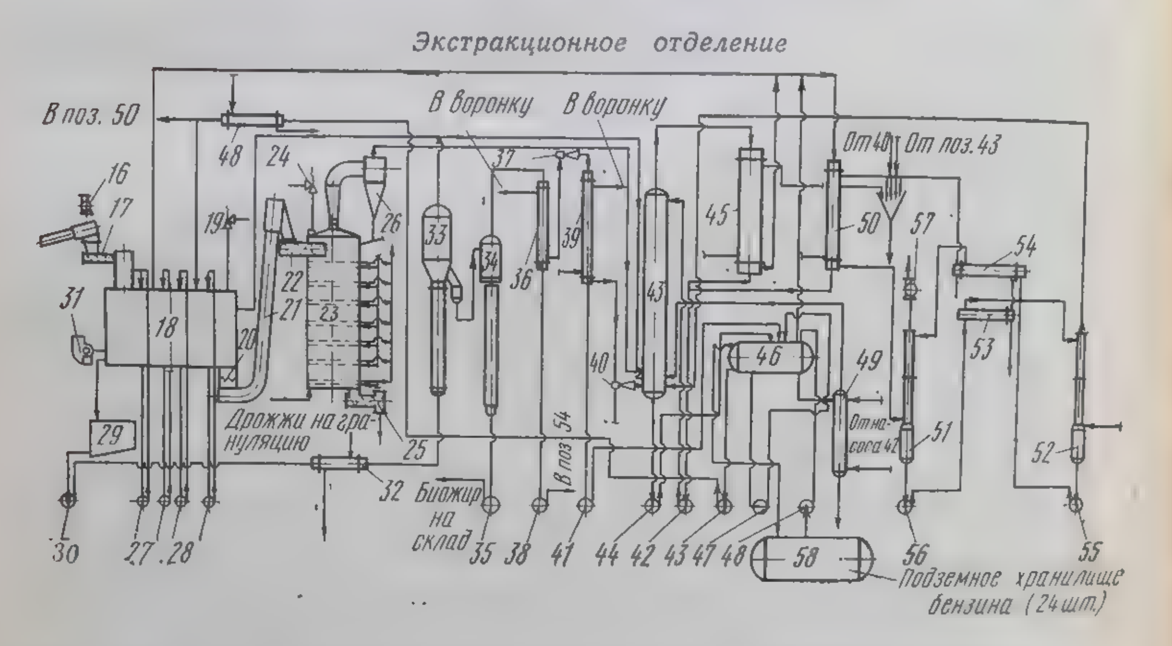


Рис. 104. Технологическая схема выделения микробных жиров:

1 — весы; *2* — бункер; *3* — элеватор; *4* — сборник-бункер; *5* — кондиционер; *6* — гранулятор; *7* — сито; *8* — питательный желоб вальцов; *9* — конвейер; *10* — вальцы; *11* — элеватор; *12* — сушилка; *13* — конвейер; *14* — элеватор; *15* — элеватор экстрактора; *16* — вентилятор элеватора; *17* — конвейер экстрактора; *18* — ротационный экстрактор; *19* — предохранительный клапан; *20* — разгрузочная мешалка экстрактора; *21* — элеватор разгрузки экстрактора; *22* — конвейер подачи дрожжей в десольвентор; *23* — десольвентор; *24* — предохранительный клапан; *25* — транспортер разгрузки десольвентора; *26* — паровой скруббер; *27* — насос мисцеллы; *28* — циркуляционный насос; *29* — сборник концентрированной мисцеллы; *30* — насос для подачи концентрированной мисцеллы; *31* — вентилятор очистки; *32* — подогреватель мисцеллы; *33* — пленочный испаритель; *34* — колонна окончательной дистилляции; *35* — насос для подачи биожира на склад; *36* — конденсатор колонны окончательной дистилляции; *37* — высоковакуумный эжектор; *38* — насос для отбора конденсата; *39* — вакуумный конденсатор; *40* — низковакуумный эжектор; *41* — насос отбора конденсата; *42* — насос питания колонны парового контакта; *43* — колонна парового контакта; *44* — насос отбора конденсата; *45* — атмосферный конденсатор; *46* — флорентина; *47* — насос для возврата отстойной воды во флорентину; *48* — подогреватель растворителя; *49* — колонна отгонки растворителя из сточных вод; *50* — выходной конденсатор; *51* — абсорбер; *52* — регенератор; *53* — подогреватель; *54* — холодильник; *55* — насос насыщенного масла; *56* — насос подачи регенерированного масла; *57* — вентилятор; *58* — подземное хранилище растворителя.

на дистилляцию для отделения биожира от растворителя. Система дистилляции обычно включает 2—3 колонны: первая колонна — пленочный испаритель *33*, вторая колонна — колонна окончательной дистилляции *34*. Для лучшего отделения растворителя от биожира в случае необходимости устанавливается дополнительно еще одна колонна. Отделенный на стадиях испарения и дистилляции, а также собранный после десольвентора растворитель проходит систему очистки и ректификации и поступает в подземное хранилище для повторного использования.

Глава 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ЛИПИДОВ — НА ОТДЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКАХ СЫРЬЯ

В настоящее время в нашей стране наиболее отработаны технологические схемы получения микробных липидов при выращивании дрожжей на гидролизатах верхового торфа и углеводородах нефти. Поэтому кратко остановимся на особенностях культивирования микроорганизмов на этих видах сырья, их составе и свойствах.

§ 1. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ГИДРОЛИЗАТАХ ТОРФА

Процесс выращивания микроорганизмов — продуцентов липидов — на гидролизатах верхового торфа малой степени разложения состоит из следующих операций: получения гидролизата торфа, отдувки фурфурола и нейтрализации гидролизата до pH 5,5—6,0, введения в гидролизат минеральных источников питания, выращивания дрожжей — продуцентов липидов, отделения биомассы и экстракции из нее липидов. Таким образом, весь этот процесс аналогичен процессу получения белковых препаратов, за исключением дополнительных операций, связанных с извлечением липидов.

Система растворителей, применяемых для этой цели, аналогична тем, которые используются в масло-жировой промышленности. Оставшаяся после экстракции биомасса используется на корм сельскохозяйственным животным.

В качестве продуцентов липидов при выращивании микроорганизмов на гидролизных средах могут быть использованы дрожжи родов Lipomyces и Cryptococcus (Lipomyces lipoferus, Cr. terricolus), а также дрожжи рода Candida (C. humicola, C. tropicalis). Содержание липидов в культурах рода Candida, выращенных на гидролизатах торфа, колеблется в пределах 29,4—39,2% к сухим веществам, на гидролизатах древесины —22,4—31,1%. Культура дрожжей L. lipoferus на гидролизатах торфа дает 38—39% липидов к сухим веществам, на гидролизатах древесины —39—40%, на смешанных субстратах — до 50,7%.

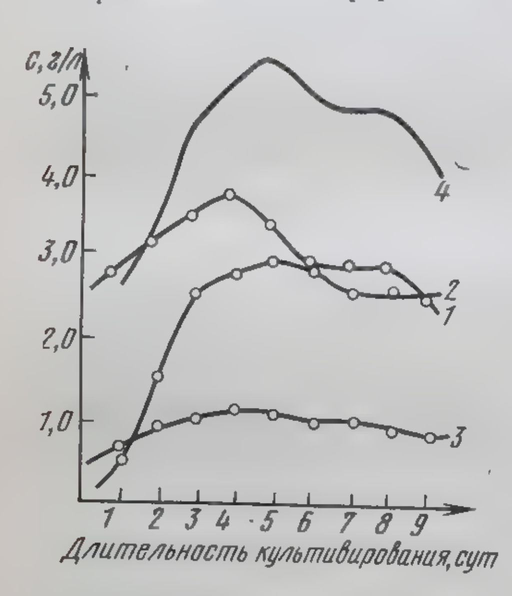


Рис. 105. Накопление соответственно биомассы (*1*, *2*) и липидов (*3*, *4*) в процессе культивирования дрожжей Cr. terricolus 20 и L. lipoferus 199 (П) на гидролизатах торфа.

Период максимального образования липидов у дрожжей совпадает с минимальным накоплением биомассы (рис. 105). Исследования взаимосвязи удельной скорости роста и образования внутриклеточных липидов показали, что в период адаптации и фазы логарифмического роста содержание липидов в клетках дрожжей снижается и происходит преимущественный синтез соединений нелипидной природы. Значительное увеличение количества липидов наблюдается в конце экспоненциальной фазы развития. В этот период происходит перераспределение жирнокислотного состава липидов. В логарифмической фазе роста уменьшается количество пальмитиновой и линолевой кислот и увеличивается — олеиновой. С уменьшением удельной скорости роста активируется синтез линолевой кислоты и происходит дальнейшее уменьшение содержания пальмитиновой (табл. 45).

Ненасыщенные жирные кислоты в дрожжевом жире составляют более 60%, из них полиненасыщенные — 2—6% от общего количества ненасыщенных кислот.

Таблица 45

Фаза роста	Содержание жирных кислот, %								
	$C_{14:0}$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}$	$C_{17:0}$	$C_{17:1}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	Сумма ненасыщенных кислот
Лаг-фаза	0,8	26,0	2,8	Следы	Следы	10,1	56,2	4,1	63,1
Экспоненциальная	Следы	23,75	2,0	0,58	0,68	8,60	62,4	2,1	67,18
Ранняя стационарная	1,1	21,2	2,17	1,24	0,67	9,50	58,77	5,06	66,67

При использовании в качестве субстратов для выращивания липидообразующих дрожжей гидролизных сред большое значение имеет подготовка гидролизата. Исследование различных способов нейтрализации гидролизатов (двухступенчатая нейтрализация, нейтрализация известковым молоком и 25%-ным раствором аммиака) показало зависимость скорости синтеза липидов от способа нейтрализации и связанного с ним соотношения углерода и азота в среде. Так, при соотношении N:C, равном 1:6, в клетках микроорганизма накапливается до 31,1% белка, содержание липидов составляет 21,7%. При изменении соотношения N:C до 1:40 происходит перераспределение направлений биосинтеза, в этом случае образуется до 35,7% липидов и только 15,0% белка. Таким образом, наиболее эффективным способом нейтрализации в данном случае является двухступенчатая нейтрализация, включающая на первой стадии нейтрализацию известковым молоком (до pH 4,0), на второй стадии — 25%-ным раствором аммиака (до pH 6,0). Экономический коэффициент в этих условиях составляет 60,6%, жировой — 15,6%.

Аэрация нейтрализата способствует удалению примесей веществ лигно-гуминового комплекса, приводит к повышению его доброкачественности.

Исходная концентрация углеводов в субстрате мало влияет на синтез биомассы и липидообразование дрожжей, однако с повышением их начальной концентрации в среде значительно удлиняется период роста культур и сдвигается максимум биосинтеза липидов. Для повышения экономической эффективности исполь-

зования субстратов рекомендуется разбавление гидролизатов до содержания РВ 1,0—2,0%. Выход биомассы в этом случае составляет 50—60% от используемых РВ.

Применение разбавленных гидролизатов оказывает влияние на состав жирных кислот. Так, у дрожжей L. lipoferus в этих условиях содержание ненасыщенных жирных кислот повышается до 70% и более (табл. 46).

Таблица 46

Концентрация РВ, %	Содержание жирных кислот, %							
	$C_{16:0}$	$C_{16:1}$	$C_{17:0}$	$C_{17:1}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	сумма ненасыщенных кислот
1,0	20,01	0,83	1,95	2,78	2,92	65,67	5,84	75,20
2,0	15,70	0,78	3,05	2,18	9,16	64,74	4,36	72,07
3,0	29,48	1,98	1,42	—	1,49	64,49	1,13	67,61
4,0	22,85	0,37	2,58	1,23	10,3	59,97	3,70	64,25

Из 1 т абсолютно сухого торфа при гидролизе его серной кислотой можно получить 50—70 кг дрожжевого жира следующего состава (%):

Фосфоглицериды	5,0—6,6
Стерины	4,8—6,0
Моно- и диацилглицерины	7,0—10,0
Свободные жирные кислоты	2,3—9,6
Триацилглицерины	70,7—75,1
Стериновые эфиры и воски	1,7—2,1

Кроме гидролизатов торфа для культивирования липидообразующих дрожжей можно использовать другие гидролизные среды. Продуцентами липидов в этом случае являются те же дрожжи Lipomyces, Sporobolomyces, Criptococcus и др., которые используются для культивирования на средах, где источником углерода являются сахара и органические кислоты.

Использование гидролизных сред с различным составом моносахаридов не оказывает существенного влияния на образование биомассы и содержание внутриклеточных липидов. При росте на древесных (гексозных и пентозных) гидролизатах, так же как и на гидроли-

Таблица 47

Субстрат	Выход биомассы, г/л	Экономический коэффициент, %	Содержание липидов		Жировой коэффициент, %
			% от сухих веществ	г/л	
Гидролизат торфа	8,6	85,0	38,1	3,3	21,9
Гидролизат древесины	6,9	40,6	39,6	2,7	16,0
Предгидролизат целлолигнина	11,7	58,5	41,8	4,9	25,0
Гидролизат целлолигнина	7,8	39,0	50,0	3,9	19,5

зате торфа, выход абсолютно сухой биомассы дрожжей составляет в среднем 7—11 г/л (табл. 47).

Наименьший выход биомассы (6,9 г/л) наблюдается при ассимиляции культурой гидролизата древесины, содержащего до 45% ксилозы. Липогенная активность, характеризуемая жировым коэффициентом, в этом случае также несколько ниже. При использовании предгидролизатов целлолигнина, моносахариды которых представлены на 45% маннозой, выход липидов (в процентах от использованных РВ) наибольший — 25,0%, экономический коэффициент приближается к коэффициенту, полученному на гидролизатах торфа.

Перспективным с экономической точки зрения является использование смешанных субстратов с оптималь-

Таблица 48

Содержание гидролизатов в субстрате, %		Выход биомассы, г/л	Экономический коэффициент, %	Содержание липидов		Жировой коэффициент, %
торфяном	древесном			% от сухих веществ	г/л	
—	100	8,7	43,6	37,5	3,3	16,3
5	95	9,3	46,6	43,2	4,0	20,1
10	90	9,2	46,1	43,9	4,1	20,2
15	85	9,8	48,9	47,3	4,6	23,1
25	75	10,8	53,8	50,7	5,5	27,2
50	50	10,6	52,8	38,4	4,1	20,2
75	25	10,2	51,1	35,7	3,7	18,2
100	—	10,9	54,6	32,9	3,6	17,9

ным соотношением гидролизатов древесины и торфа (табл. 48). Богатый набор активаторов роста в гидролизатах древесины стимулирует рост дрожжей при содержании их в смеси субстратов более 10%. Наибольший жировой коэффициент наблюдается при соотношении гидролизата торфа к гидролизату древесины 25:75. Увеличение содержания гидролизатов торфа в смеси выше 25% приводит к торможению липогенеза за счет повышения содержания свыше допустимого лигно-гуминовых веществ.

Жирнокислотный состав липидов дрожжей с повышением концентрации гидролизата древесины сдвигается в сторону повышенного образования линолевой кислоты, что связано со специфическим влиянием ксилозы.

Использование смесей предгидролизатов и гидролизатов целлолигнина приводит к обильному синтезу биомассы (выход сухой биомассы составляет 54,2 — 63,5% от РВ) с одновременным значительным накоплением как липидов (до 39,4 — 40,8%), так и белка (23,8 — 27,3%).

§ 2. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ НА УГЛЕВОДОРОДНЫХ СРЕДАХ

Получение микробного жира при выращивании микроорганизмов на углеводородсодержащих средах значительно отличается от изложенного. Для культивирования микроорганизмов используются дрожжи, но не специальные штаммы липидообразующих дрожжей, а те виды, которые применяются для получения кормовых дрожжей на углеводородах, — это прежде всего дрожжи рода Candida. Кроме того, известно много представителей рода Mycobacterium, способных окислять углеводороды с образованием значительных количеств липидов. К наиболее продуктивным из них по жиру можно отнести виды Mycobacterium rubrum, штамм 134 и Mycobacterium sp., штамм 3. Штамм 134 по сравнению с другими культурами обладает наибольшей способностью к биосинтезу липидов на среде с *н*-гексадеканом. При использовании глюкозы накопление липидов этой культурой уменьшается вдвое.

Суммарное количество клеточных липидов, получаемое при культивировании микроорганизмов на средах с углеводородами, значительно возрастает. Углеводороды стимулируют синтез липидов, перед началом использования углеводородов из среды содержание липидов в клетке удваивается. Это связано с механизмом потребления субстрата, так как клеточные липиды играют важную роль в ассимиляции углеводородов, аккумуляции липофильных субстратов. Липиды играют роль растворителя в транспорте парафинов от клеточной поверхности до места энзиматического действия.

Проникновение парафина начинается с контакта клетки и углеводородов, которые адгезируются на поверхности клетки и растворяются в липидах оболочки. По гидрофобным участкам цитоплазматической мембраны они проникают к месту локализации ферментов и там окисляются.

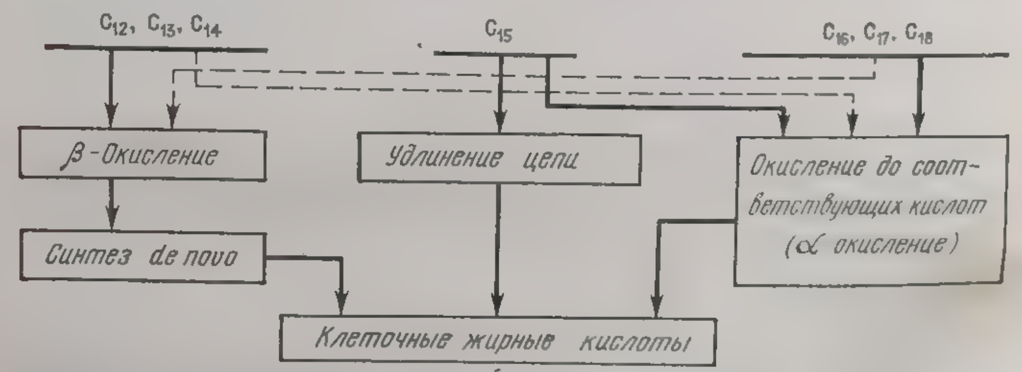
Замена углеводного субстрата углеводородным приводит не только к количественному изменению содержания липидов в клетке, но и к изменению их фракционного состава. При этом наблюдается увеличение количества синтезируемых фосфоглицеридов и снижение триацилглицеридов. Эти изменения зависят также от вида используемой культуры. Так, в бактериальных клетках Micrococcus freudenvechii, выращенных на углеводородах, содержание фосфоглицеридов увеличивается в 4—8 раз, эфиров — в 15 раз по сравнению с их содержанием при выращивании на глюкозе. Изменений во фракциях свободных жирных кислот и ацилглицеринов не обнаруживается.

На количественный и качественный состав липидов и других полимеров значительное влияние оказывает исходный состав *н*-алканов субстрата. Для дрожжей C. guilliermondii, дающих наибольший выход биомассы и белка при выращивании на *н*-алканах C_{14} — C_{17}, расширение спектра углеводородов в среде или уменьшение их молекулярной массы приводит к улучшению липидообразования. Использование облегченного состава парафинов (C_{12} — C_{16}) вызывает увеличение содержания фосфоглицеридов до 50%. Расширение спектра *н*-алканов до C_{17} приводит к повышению почти вдвое относительного содержания триацилглицеринов и уменьшению содержания фосфоглицеридов.

Жирнокислотный состав липидов микроорганизмов также зависит от состава субстрата. Жирные кислоты липидов дрожжей, выращенных на углеводах, содержат незначительное количество кислот с нечетным числом углеродных атомов и представлены в основном C_{16} и C_{18}-кислотами. При выращивании дрожжей на углеводородных средах преобладают C_{14} и C_{18}-кислоты. Необходимо отметить, что жирные кислоты микроорганизмов, выращенных на средах с индивидуальными *н*-алканами, как правило, имеют длину цепи алкана-субстрата или измененную на некоторое количество C_2-фрагментов. Дикарбоновые кислоты, оксикислоты или кислоты с разветвленной цепью в продуктах биосинтеза обнаружены не были.

Применение «нечетных» углеводородов в качестве источника углерода приводит к преимущественному содержанию в липидах клетки жирных кислот с нечетным числом атомов углерода, в частности C_{17}-кислот. При выращивании дрожжей на C_{13}, C_{15} и C_{19}-алканах в клетках присутствует значительное количество C_{15}-кислот.

Биосинтез липидов клетками микроорганизмов, выращенных на *н*-алканах с четным и нечетным количеством атомов, можно представить в виде



На *н*-алканах с нечетным числом углеродных атомов и короткой цепью жирные кислоты (C_{17}) синтезируются путем удлинения цепочки, а «четные» жирные кислоты (C_{16} и C_{18}) — путем de novo синтезирующего механизма из C_2-единиц, образовавшихся β-окислительной деградацией ростового субстрата. На субстратах с длинной цепью и нечетным количеством атомов углерода интенсивность синтеза de novo снижается, преобладает непосредственное включение C_2-единиц в состав жирных кислот, образовавшихся при окислении,

При выращивании микроорганизмов на средах, содержащих углеводороды с длинной цепью атомов углерода, синтезируемые жирные кислоты имеют длину цепи субстрата. Наличие жирных кислот с длиной цепи, укороченной на C_2-фрагменты, указывает на β-окисление первичных кислот. О возможности α-окисления говорит наличие кислот, укороченных на 1 углеродный атом.

§ 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БЕЛКОВО-ЖИРОВЫХ ДРОЖЖЕЙ НА ПАРАФИНАХ НЕФТИ

Дрожжи на углеводородах нефти могут выращиваться как по специальному жировому режиму (когда соотношение C : N = 30 : 1), так и по белковому (соотношение C : N = 15 : 1). При этом фракционный состав липидов, а также соотношение отдельных жирных кислот в липидах будут различны. В липидах дрожжей, выращенных по белковому режиму, в 3 раза больше фосфоглицеридов, в 4 — стеринов, в 2 — моно- и диацилглицеринов и в 2 раза — свободных жирных кислот, но значительно меньше триацилглицеринов и стериновых эфиров. Дрожжи, выращиваемые по жировому режиму, синтезируют больше ненасыщенных жирных кислот.

Во ВНИИсинтезбелке разработана технология культивирования белково-жировых дрожжей двухстадийным непрерывным методом. На первой стадии дрожжи выращивают по белковому режиму при подаче парафина в количестве 1% к протоку и скорости разбавления $D=0{,}1\div0{,}125$ ч$^{-1}$. На второй стадии дрожжи «ожиривают» за счет недостаточного снабжения их азотом при подаче парафина в количестве 1,2% к протоку и скорости разбавления 0,1 ч$^{-1}$. Недостатками этого метода являются его длительность и необходимость установки дополнительного ферментатора.

В Московском институте химического машиностроения были проведены исследования по одностадийному непрерывному культивированию дрожжей Candida lipolytica М-62 на очищенных жидких парафинах. Опыты проводили при подаче парафина в количестве 1,5—2% к протоку и скорости разбавления 0,19—0,2 ч$^{-1}$. Содержание липидов в биомассе достигало 23—25%, при этом в ней накапливалось до 25% остаточных парафинов.

Подобные исследования проводились во ВНИИсинтез-

белке. Непрерывный процесс получения белково-жировых дрожжей Candida guilliermondii Н-143 был начат со скоростью разбавления 0,1 $ч^{-1}$ и подачей парафина в количестве 1; 1,2 и 2% к протоку. При достижении 1,2%-ной концентрации парафина в биомассе начинало накапливаться значительное количество остаточных углеводородов. Для снижения их содержания скорость разбавления была уменьшена до 0,07 $ч^{-1}$, концентрация парафина увеличена до 2% при содержании азота в среде 70—100 и 50—60 мг/л. Процесс продолжался 25 сут. Культура Н-143 при 2%-ной концентрации парафина (к протоку) и $D=0{,}07$ $ч^{-1}$ накапливала до 16—18% липидов. Выход дрожжей составлял 58%. Увеличение концентрации парафина при прочих равных условиях не влияло на биосинтез липидов, но снижало выход биомассы до 50,5—52%, при этом количество остаточных углеводородов в дрожжах увеличивалось с 1—3 до 4—6%.

Дрожжи Candida species П-1 в условиях одностадийного непрерывного процесса также сохраняют способность к повышенному накоплению липидов (до 23,6%) при выходе биомассы 64%. При этом содержание остаточных углеводородов в биомассе составляет в среднем 3%.

Химический состав белково-жировых дрожжей, полученных одностадийным непрерывным методом культивирования на очищенных жидких парафинах, представлен в табл. 49. Как можно видеть, по химическому составу дрожжи различных культур довольно близки.

Таблица 49

Состав	Содержание (в % на сухую массу) при выращивании дрожжей	
	Candida species П-1	Candida guilliermondii Н-143
Липиды	18,6—23,6	16,3—18,2
Белок	28,7—43,0	30,4—49,0
Зола	5,6—10,7	4,0—6,1
P_2O_5	3,1—5,5	6,5—8,5
Остаточные углеводы	0,2—6,0	3,7—4,5
Влага	5,2—6,0	1,7—3,4

Часть IV.
ТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ

Производство аминокислот год от года увеличивается. Особый интерес представляет промышленное получение незаменимых аминокислот.

Известно, что в природные белки входит 20 аминокислот, из которых восемь не могут синтезироваться в организме животных. К незаменимым аминокислотам относятся фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и валин. Недостаток даже одной из незаменимых аминокислот в пище человека и в кормах сельскохозяйственных животных может привести к серьезному нарушению обмена веществ в организме, к замедлению его роста и развития.

В промышленных масштабах в настоящее время получают (микробиологическим и химическим способами) 15 аминокислот: аланин, глицин, лизин, гистидин, цистин, цистеин, аспарагиновую кислоту, аспарагин, серин, треонин, фенилаланин, триптофан, тирозин, аргинин, глутаминовую кислоту. Из незаменимых аминокислот налажено широкое производство *L*-лизина, *DL*-метионина, *L*-триптофана и *L*-треонина. Кроме этих аминокислот в больших количествах производятся *L*-глутаминовая кислота и глицин. Ведутся исследования по разработке способов получения других незаменимых аминокислот.

Глава 1. ХАРАКТЕРИСТИКА АМИНОКИСЛОТ И ОБЛАСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Наибольшее народнохозяйственное значение и особенно в животноводстве, имеют аминокислоты. Сбалансированность кормов по аминокислотам является важным показателем полноты их использования животны-

ми и величины затраты кормов на единицу продукции: обогащение кормов недостающими незаменимыми аминокислотами позволяет снизить затраты кормов в 1,65—2,55 раза.

Одной из наиболее важных аминокислот является лизин, так как многие белки растений именно эту аминокислоту содержат в незначительном количестве, а потребление и усвоение белкового азота пропорционально минимальному содержанию в нем лимитирующей незаменимой аминокислоты.

В настоящее время добавление лизина в корма сельскохозяйственных животных осуществляется достаточно широко. Его используют для обогащения кормов, предназначенных для молодняка (свиней, кур, птицы, крупного рогатого скота). При этом увеличивается скорость роста животных и птицы, улучшается качество мяса, у овец улучшаются количество и качество шерсти. Лизин используют и для обогащения прикорма в рыбоводческом хозяйстве.

Другое направление использования аминокислот для сельского хозяйства связано с получением эффективных средств защиты растений, не имеющих губительных последствий для окружающей среды и не проявляющих токсичность по отношению к теплокровным животным и человеку. Успешная борьба с сорняками, вредителями и болезнями растений может на $1/3$ повысить объем получаемой сельскохозяйственной продукции, что ставит эту проблему в число важнейших.

Высокой гербицидной активностью обладают многие производные *DL*- и *L*-аминокислот. Для получения гербицидов, например, используют различные производные глицина, аланина.

С помощью аминокислот получают соединения, которые применяются для удаления листьев с различных культурных растений (для этой цели используются *L*-лизин и некоторые его предшественники).

Некоторые производные аминокислот могут оказывать стимулирующее или ингибирующее действие на прорастание и рост растений. Так, производные *L*-валина, *L*-метионина, *L*-лейцина задерживают рост ряда растений, в то время как триптофан ускоряет его; *L*- и *DL*-метионин, кальциевые и бариевые соли метионина, его алифатические эфиры являются эффективными стиму-

ляторами роста некоторых овощей и фруктовых деревьев.

В сочетании с некоторыми соединениями пролин, *L*-фенилаланин, *L*-цистеин, *L*-треонин, а также их производные являются препаратами, препятствующими разложению хлорофилла, способствующими увеличению размеров листьев, ускорению роста растения и т. д.

Производные аминокислот (глутамина, треонина, валина, глицина, аланина, серина, метионина, глутаминовой и аспарагиновой кислот) предлагается использовать в качестве фунгицидных препаратов при борьбе с различными микробными заболеваниями растений. Обладая высокой фунгицидной активностью, они по сравнению с химическими препаратами более быстро разлагаются в природных условиях и поэтому не представляют опасности для окружающей среды.

Помимо сельского хозяйства одним из главным потребителей лизина и других аминокислот является пищевая промышленность. Аминокислоты, и прежде всего лизин, могут быть использованы в качестве обогатителя пищевых растительных продуктов для повышения их питательной ценности и для сбалансирования пищи по незаменимым аминокислотам. В Японии ведутся исследования и получены положительные результаты по балансированию пищевых продуктов путем введения в них *L*-треонина и *DL*-триптофана, особенно перспективно введение недостающих аминокислот в детское питание, в диетические и специальные пищевые продукты.

Весьма перспективно использование некоторых аминокислот в качестве приправ, так как они обладают определенными вкусовыми свойствами и могут помимо питательной ценности сообщать продукту приятные аромат и вкус.

Большое распространение в пищевой промышленности имеет глутаминовая кислота, которая используется в виде натриевой соли. Эта соль является эффективным усилителем вкуса, используется для улучшения вкуса мясных и овощных блюд, добавляется во все продукты при консервировании, замораживании и длительном хранении.

Многие аминокислоты обладают оригинальным вкусом и участвуют в образовании вкусовых особенностей тех или иных пищевых продуктов.

Например, *D*-триптофан в 35 раз слаще сахарозы, *D*-изомеры горьких аминокислот обычно обладают сладким вкусом, *L*-аспарагиновая и *L*-глутаминовая кислоты кислые на вкус, а в нейтральных растворах имеют очень приятный и оригинальный вкус, глицин обладает характерным вкусом «освежающей» сладости, которая по интенсивности близка к сахарозе.

Аминокислоты могут входить в состав сложных композиций, усиливающих вкусовые ощущения. Известен вкусовой синергический эффект в сочетании определенных аминокислот и мононуклеотидов, аминокислот и органических кислот, нескольких аминокислот и т. д. Некоторые производные аминокислот имеют очень характерные свойства, например эфирхлоргидрат третичного бутилового спирта и *L*-аланина обладают сладостью, в 75 раз превышающей сладость сахарозы, а метиловые эфиры *L*-аспартил-*о*-третичный бутил-*L*-серин и *L*-аспартил-*о*-третичный амил-*L*-серин в 130—200 раз слаще сахарозы, по характеру сладости близки к ней и могут очень широко использоваться в пищевой промышленности, особенно для диетического и диабетического питания.

Дополнительное введение в ряд животных продуктов аминокислот в сочетании с другими соединениями также может способствовать улучшению вкусовых достоинств продукта. Например, при термической обработке пищи возникает реакция меланоидинообразования, приводящая к образованию специфического аромата свежеиспеченного хлеба, карамели, картофеля, шоколада и т. д. В возникновении таких ароматов играют первостепенную роль аминокислоты, такие, как пролин, глицин, метионин, валин и др.

Аминокислоты могут с успехом использоваться не только для повышения питательной ценности пищевого продукта, но и как соединения, помогающие снять неприятные или нежелательные запахи. Лизин, орнитин, гистидин, аланин, пролин, валин, лейцин и некоторые другие аминокислоты используются в качестве дезодорантов различных пищевых продуктов.

Для улучшения органолептических показателей мясных и рыбных продуктов, придания им специфического приятного вкуса, аромата и сообщения мягкости используют аргинин, гистидин, лизин, цистин. Такие аминокислоты, как цистеин, цистин, в сочетании с *L*-моноглутаматом натрия создают имитацию запаха и вкуса мяса, что очень важно при приготовлении приправ, концентратов и особенно при создании новых видов пищи.

В пищевой промышленности аминокислоты могут быть использованы как антиокислители. Такими свойствами обладают метионин, лизин, триптофан, аргинин, аспарагин, норлейцин. В качестве антиокислителя для моно- и диглицеридов применяют глицин. Добавка к порошковому молоку гистидина и триптофана снимает неприятный «окисленный» привкус. Жиры в пищевых продуктах прогоркают значительно меньше, если в них добавлены соли лизина и фитиновой кислоты.

Интересны исследования по получению окрашенных соединений с участием аминокислот. При температуре 100—120° С и сильнощелочной реакции среды глицин, аланин, лизин, орнитин, аргинин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты взаимодействуют с глюкозой и другими сахарами и образуют прекрасные пищевые красители, которые обладают антиокислительным действием и к тому же ингибируют действие липоксидазы.

Большое значение придается в пищевой промышленности цистеину и цистину, дополнительное введение которых в пищевые продукты способствует торможению реакций, ведущих к потемнению продукта. При этом усиливается действие консервантов, стабилизируется аскорбиновая кислота, замедляется аутоокисление жиров.

Таким образом, самые различные аминокислоты находят широкое применение в различных отраслях пищевой промышленности, повышая питательную ценность пищевых продуктов, участвуя в улучшении их органолептических показателей и повышая их стабильность при длительном хранении.

Помимо пищевой промышленности и сельского хозяйства аминокислоты и их производные могут быть использованы при синтезе поверхностно-активных веществ (ПАВ), как добавки к моторным топливам, при синтезе полимеров, в электрохимии, фотографии, медицине, при получении гербицидов и т. д. Так, на основе аминокислот путем введения либо в аминную, либо в карбоксильную группы кислоты гидрофобной части создают анионоактивные или катионоактивные ПАВ. Для создания такого рода ПАВ обычно используют аспарагиновую или глутаминовую кислоты. Эти ПАВ-производные аминокислот могут быть использованы в различных моющих средствах, эмульгаторах, диспергаторах, бактерицидных

средствах. Они легко разлагаются в природных условиях и не загрязняют окружающую среду и в то же время обладают той же моющей способностью, что и мыло, но имеют во много раз меньшую токсичность.

Введение в бензин в небольших количествах (от 0,0005 до 0,1%) производных аспарагина позволяет до минимума снизить отложения в карбюраторах двигателей, препятствует образованию нагара, корродированию металла, предотвращает обледенение.

Весьма перспективно использование аминокислот в изготовлении искусственных волокон, кожи, пленок различного назначения. Здесь большое будущее принадлежит полиаминокислотам, которые получают полимеризацией *N*-карбоксиангидридов аминокислот:

$$H_2NCHRCOOH \xrightarrow[\text{(фосген)}]{COCl_2} \begin{matrix} CHR-CO \\ | \qquad\quad \\ NH-CO \end{matrix}\!\!>O \xrightarrow{\text{Полимеризация}} H-\left[HNCHRCO\right]_n-OH.$$

Обычно полиаминокислоты имеют в своем составе один вид аминокислоты, чаще всего практическое значение имеет полимер, состоящий из производных глутаминовой кислоты. Этот полимер используют для изготовления или покрытия синтетической кожи, волокна, пленок. Такие кожи и ткани очень напоминают по внешнему виду натуральные кожи и натуральную шерсть и шелк, а по многим другим показателям превосходят последние: они более носки, прочнее и эластичнее натуральных.

Из модифицированных полиаминокислот можно получать специальные волокна и материалы, которые, например, легко рассасываются в живом организме, что очень важно в хирургии, или, наоборот, обладают повышенной способностью к химических реагентам и физическим воздействиям. Пленки, волокна, ткани, полученные из полиаминокислот или их производных, могут найти широкое применение в медицине, пищевой, фармацевтической промышленности. Главными достоинствами этих соединений являются их безвредность, индифферентность по отношению к организму человека, сравнительно быстрое разложение в природных условиях.

В электрохимии аминокислоты могут быть использованы в качестве комплексообразователей и для прида-

ния электролиту высокой буферности, что способствует получению высококачественных осадков. В этой области применения особое значение придается глицину.

В фотографии для улучшения качества негативов и позитивного материала рекомендуется использовать преимущественно цистеин, цистин или их производные. Есть также указания о возможности эффективного использования в фотографии аргинина, его солей и поверхностно-активных производных аспарагиновой кислоты.

Аминокислоты широко используются в фармакологии. Для фармацевтических целей аминокислоты очень тщательно очищают, и потому их стоимость значительно выше стоимости аминокислот, производимых для всех других целей.

Многие аминокислоты уже давно используются в виде лекарственных форм для профилактики и лечения ряда заболеваний. К ним относятся такие аминокислоты, как метионин, гистидин, глутаминовая кислота, глицин. Известно, что аминокислоты, так же как витамины, гормоны, ферменты, являются жизненно важными, биогенными соединениями. Нарушение процесса их синтеза в организме, отсутствие или избыток аминокислот приводят к серьезным заболеваниям, поэтому в медицине все больше внимания уделяется вопросу применения аминокислот и их производных в фармацевтических целях.

Помимо вышеперечисленных аминокислот в фармакологии широкое применение в последнее время получили аргинин, орнитин, аспарагиновая кислота, лизин, триптофан, фенилаланин, тирозин, цистеин и некоторые их производные.

Возможно использование аминокислот и их производных в косметике. Добавление аминокислот в различные косметические средства помогает поддерживать нормальную функцию кожи, защищает против бактерий, тонизирует кожу, повышает увлажняющий эффект, делает более безвредными красители для волос, укрупняет и питает волосы, помогает избавить волосы от избытка жира, улучшает качество губной помады, лака для волос и т. д. Для этих целей рекомендуется использование аргинина, глицина, L-аланина, валина, цистеина, метионина, треонина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Таким образом, даже краткий обзор возможных путей использования аминокислот показывает их большое

значение и перспективность использования во многих отраслях промышленности, в сельском хозяйстве, в быту и медицине.

Однако далеко не все аминокислоты получают в мировой практике в достаточном количестве и требуемой степени очистки. Их широкое применение ограничивается сейчас не столько малым объемом производства, сколько высокой стоимостью. По-видимому, удешевление производства аминокислот позволит резко расширить область их применения и увеличить объем производства.

Глава 2. СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

Существует три возможных пути получения аминокислот:

выделением их из различных гидролизатов белков, химическим синтезом и использованием микроорганизмов, способных продуцировать значительные количества свободных аминокислот.

Учитывая, что в данном учебнике рассматриваются преимущественно микроорганизмы — продуценты тех или иных соединений, наиболее подробно рассмотрим третий путь получения аминокислот.

§ 1. ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ ИЗ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

Для получения аминокислот могут быть использованы отходы мясоперерабатывающей промышленности (кератиновое сырье, кровь и т. д.), яичный белок, казеин молока, различные отходы переработки растений, содержащие белки (клейковина пшеницы, соевый шрот и т. д.), белки микроорганизмов (кормовые дрожжи). При переработке этого сырья все аминокислоты переходят в гидролизат, и для выделения отдельных аминокислот требуется сложная многостадийная очистка. Кроме того, само сырье весьма дефицитно и дорого, поэтому такой способ получения аминокислот ограничен, а сами аминокислоты имеют высокую себестоимость.

Для гидролиза сырья используют кислоты, щелочи и ферменты. При кислотном гидролизе белков бóльшая часть триптофана разрушается, цистеин окисляется в

цистин, серин и треонин распадаются. При щелочном гидролизе триптофан сохраняется несколько лучше, но практически полностью разрушаются серин, аргинин, цистин и цистеин. При ферментативном гидролизе белков аминокислоты не разрушаются, но требуется сложная подготовка сырья, белок должен быть в растворимом или легкодоступном виде. Гидролиз редко идет до конца, поскольку большинство протеолитических ферментов не проявляют сродства к разрыву всех пептидных связей в субстрате и потому в гидролизате накапливается сложная смесь аминокислот и пептидов различной молекулярной массы, кроме того, в гидролизатах остаются сам фермент или продукты его частичного разрушения, что также накладывает определенные трудности на процесс выделения из этой смеси отдельных аминокислот.

Несмотря на трудности получения отдельных аминокислот из гидролизатов, это все же весьма важный источник получения их в смеси, особенно из кератинового сырья, которое включает в себя отходы обработки животного сырья. Гидролизаты этого сырья после небольшой очистки и обработки могут быть непосредственно использованы для вскармливания сельскохозяйственных животных или служить полупродуктом для выделения аминокислот.

§ 2. ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ ХИМИЧЕСКИМ СИНТЕЗОМ

Путем органического синтеза в мировой практике получают многие аминокислоты. Недостатком этого способа является то, что в процессе синтеза образуется смесь *D*- и *L*-форм аминокислот, которую крайне трудно разделить. Кроме того, *D*-форма в подавляющем большинстве случаев является балластом, так как не усваивается животными и человеком, а некоторые *D*-формы аминокислот обладают токсическими свойствами.

Методом органического синтеза получают *DL*-метионин, глутаминовую кислоту, лизин, триптофан, треонин, глицин и многие другие кислоты. Получение аминокислот методом органического синтеза — многостадийный процесс, требующий использования сложных реагентов и тщательной очистки продукта от нежелательных со-

путствующих соединений. Но технология получения аминокислот химическим методом постоянно совершенствуется, изыскиваются новые, более рациональные пути синтеза, разделения рацемических смесей, способы превращения *D*-формы в *L*-форму и т. д.

Себестоимость синтетических аминокислот постепенно снижается, в связи с этим появляется экономически оправданная возможность широкого использования синтетических аминокислот и их производных в различных отраслях народного хозяйства, в медицине.

§ 3. ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ С ПОМОЩЬЮ МИКРООРГАНИЗМОВ

Этот способ получения аминокислот возник сравнительно недавно — в 60-х годах нашего столетия. Среди микроорганизмов, продуцирующих свободные аминокислоты, были найдены сотни видов и штаммов. Отобраны и селекционированы продуценты глутаминовой кислоты, лизина, изолейцина, валина и многих других аминокислот.

Очевидным преимуществом этого способа является то, что микроорганизмы образуют аминокислоты в биологически активной *L*-форме, образование аминокислот в *D*-форме является редчайшим исключением. Это значительно облегчает выделение и очистку аминокислот, а также позволяет получать технические препараты для обогащения кормов сельскохозяйственных животных с низкой (приемлемой для животноводства) себестоимостью.

Аминокислоты с помощью микроорганизмов получают во многих странах. В нашей стране с 1971 г. в промышленных масштабах микробиологическим путем получают только *L*-лизин, но ведутся широкие исследования по получению с помощью микроорганизмов *L*-глутаминовой кислоты, *L*-триптофана и других аминокислот.

Несмотря на высокие темпы развития микробиологической промышленности, потребность в аминокислотах пока удовлетворяется только на 25—30%, и потому в последующие годы намечается всемерное развитие этого направления и дальнейшее увеличение объема производства аминокислот путем микробного синтеза.

Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО *L*-ЛИЗИНА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ

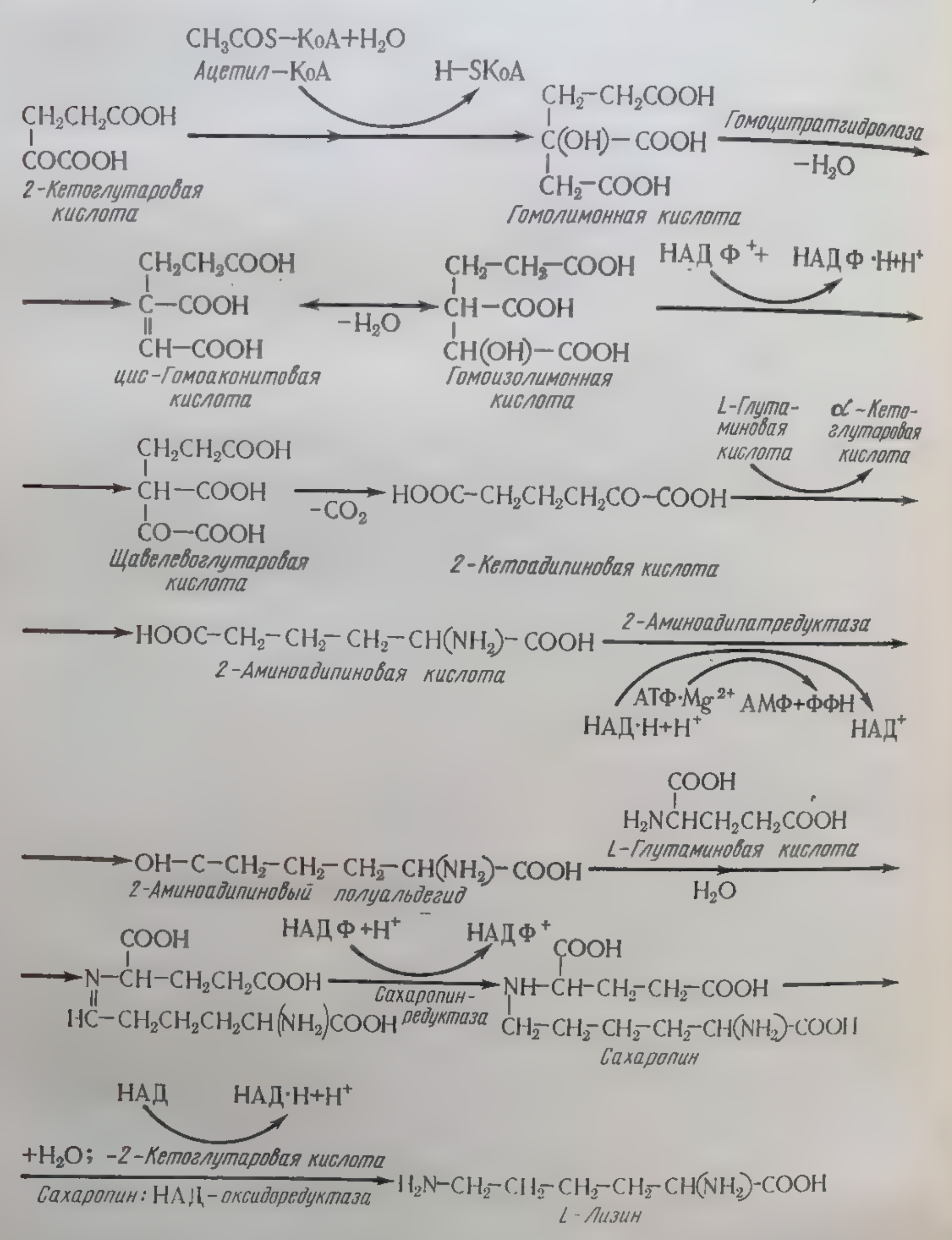
В 50-х годах в Японии Киносита с сотр. был открыт вид микроорганизмов Micrococcus glutamicus, его правильнее было бы назвать Corynebacterium glutamicum, обладающий способностью к сверхсинтезу глутаминовой кислоты. Углубленное изучение этой группы микроорганизмов показало, что при определенной направленной селекции можно получить мутанты, обладающие также способностью к сверхсинтезу *L*-лизина. Поэтому большинство продуцентов *L*-лизина в настоящее время можно отнести к группе бактерий, называемой Corynebacterium.

Известно, что синтез аминокислот в клетке ведется очень экономно и целенаправленно, под контролем специальных регулирующих систем. Регуляторный контроль обычно осуществляется по принципу обратной связи на уровне начального фермента или ферментов данного специфического пути образования метаболита. В случае значительного повышения уровня конечного продукта (в данном случае *L*-лизина) включается механизм регуляции и один из ферментов в цепи последовательных превращений блокируется, синтез прекращается. Цель этого регулирования — предотвратить избыточное образование и накопление данного метаболита, потребность в котором организма в настоящий момент полностью удовлетворяется. Но такая безупречная логика синтеза существует лишь у микроорганизмов, не имеющих нарушений и дефектов в этом механизме. В природных условиях такие нарушения достаточно редки, но они все же встречаются. Например, найдено немало природных микроорганизмов, обладающих способностью к сверхсинтезу глутаминовой кислоты, аланина, валина. В то же время таких продуцентов по лизину, гомосерину, треонину и некоторым другим аминокислотам в природных условиях найдено не было. Для получения промышленных продуцентов пришлось пойти по пути получения мутантов, имеющих генетический дефект регуляторного контроля процесса биосинтеза этих аминокислот.

§ 1. БИОСИНТЕЗ ЛИЗИНА В МИКРОБНОЙ КЛЕТКЕ

Биосинтез лизина у различных микроорганизмов протекает по-разному. Существует два принципиально раз-

личных пути биосинтеза лизина. Один из них идет, начиная с 2-кетоглутаровой кислоты, через 2-аминоадипиновую кислоту (а м и н о а д и п и н о в ы й   п у т ь):



По этому пути лизин образуется в клетках дрожжей, грибов, актиномицетов и некоторых видов водорослей.

Регуляция биосинтеза L-лизина по аминоадипиновому пути изучена сравнительно мало, но все же известно, что

она идет по первому ферменту, катализирующему превращение 2-кетоглутаровой кислоты в гомолимонную кислоту, так как избыток лизина в среде заметно тормозит образование гомолимонной кислоты.

Второй путь (диаминопимелиновый) начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через 2,6-диаминопимелиновую кислоту (ДАП).

Такой путь имеет место в бактериальных клетках. Эта сложная схема образования *L*-лизина расшифрована при использовании мутантов, дефицитных по различным ферментам в цепи превращения аспарагиновой кислоты до *L*-лизина.

Этот путь образования *L*-лизина был подробно изучен у E. coli, а позднее было показано, что и у основных продуцентов лизина, и у глутаматсинтезирующих бактерий биосинтез идет по диаминопимелиновому пути.

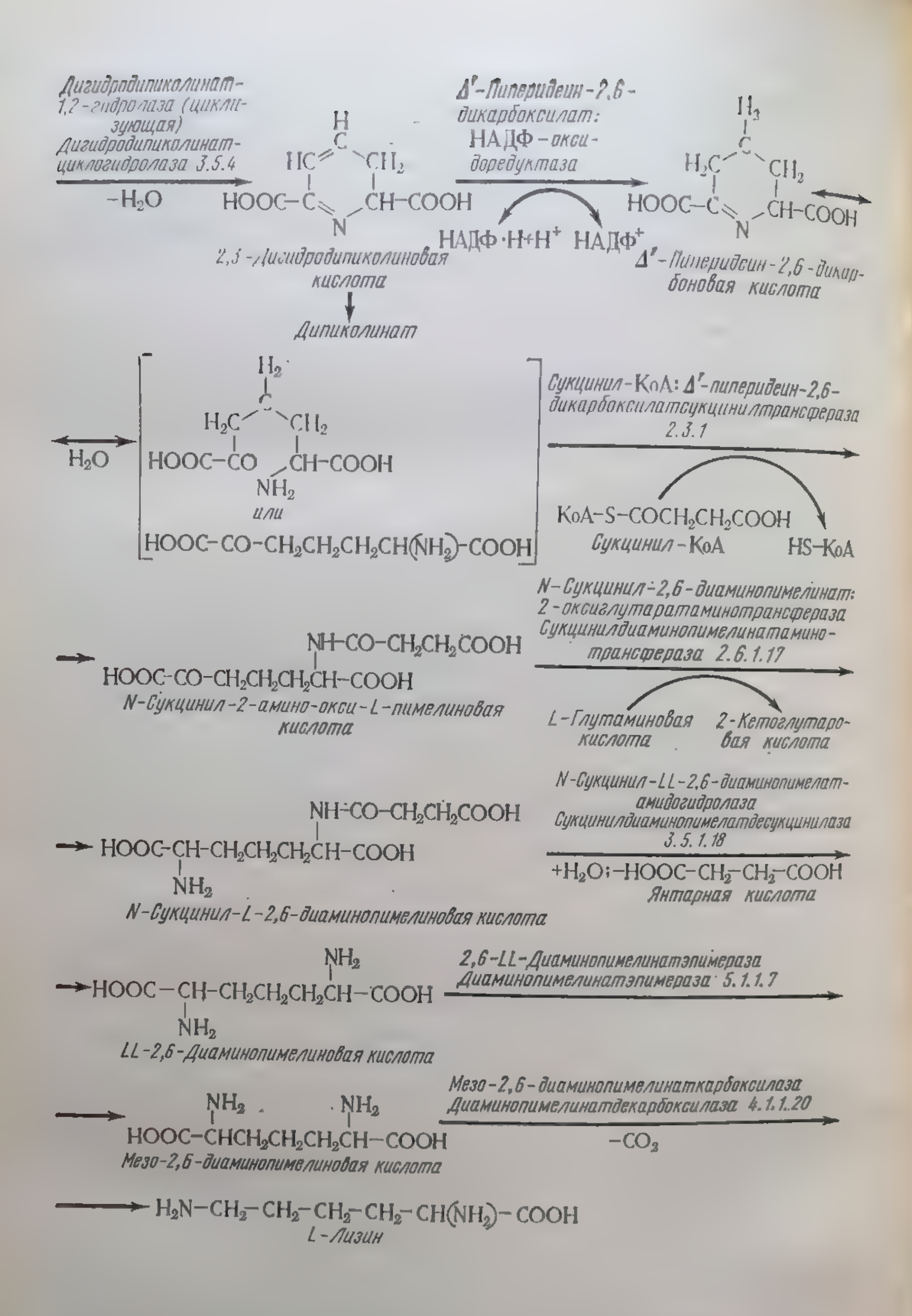
Эта сложная схема образования *L*-лизина расшифрована при использовании различных мутантов, дефицитных по определенным ферментам в цепи превращения аспарагиновой кислоты до *L*-лизина. Аспарагиновая кислота под действием фермента β-аспартаткиназы превращается в β-фосфоаспартат, а далее в аспартат-3-полуальдегид. Этот промежуточный метаболит очень важен, так как из него могут синтезироваться пять аминокислот: лизин, гомосерин, метионин, треонин и изолейцин.

В этой схеме есть несколько конечных продуктов обмена, которые включаются в биосинтез других соединений. Прежде всего это мезо-2,6-диаминопимелиновая кислота, которая входит в состав клеточных стенок, и 2,3-дигидродипиколиновая кислота (дипиколинат), участвующая в формировании спор в клетке.

$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ (Аспартат) —β-Аспартаткиназа→ β-Фосфоаспартат —L-Аспартат-β-полуальдегид: НАДФ-оксидоредуктаза 1.2.1.11→

→ $HOOC-CO-CH_3$ (Пировиноградная кислота) + $OHC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ (Аспартат-3-полуальдегид) —H_2O→ [$HOOC-CO-CH=CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$] →

Аспартат-3-полуальдегид —Гомосериндегидрогеназа→ Гомосерин —①→ Метионин; Гомосерин —②→ Треонин —①→ Изолейцин



При сопоставлении системы регуляции биосинтеза лизина по диаминопимелиновому пути у различных бактерий видно (рис. 106), что они неодинаковы. В случае

Brevibacterium flavum и Corynebacterium glutamicum (промышленных продуцентов лизина) первый фермент диаминопимелинового пути β-аспартаткиназа не имеет системы изоферментов и не ингибируется, и не репрессируется ни одним из конечных продуктов, как это имеет место у E. coli. Ингибирование этого фермента наблюдается только при совместном действии двух конечных ме-

Рис. 106. Регуляция биосинтеза лизина у бактерий:

а — E. coli; *б* — глутаматсинтезирующих; — — — репрессия; → ретроингибирование: *1*—аспарагиновая кислота; *2* — полуальдегид аспарагиновой кислоты

таболитов: лизина и треонина. Это существенное отличие и позволило получить ауксотрофные мутанты, у которых нет факторов, предотвращающих сверхсинтез *L*-лизина.

Аспарагиновая кислота при биосинтезе лизина образуется у глутаматсинтезирующих бактерий за счет реакции переаминирования, которая осуществляется между щавелевоуксусной и глутаминовой кислотами.

§ 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ *L*-ЛИЗИНА

Существует два способа промышленного получения лизина с помощью микроорганизмов: двухступенчатый и одноступенчатый.

Двухступенчатый способ предусматривает использование в качестве основного сырья предшественников *L*-лизина, полученных химическим или биологическим методом. В качестве предшественников могут быть использованы *L*- и *DL*-диаминопимелиновая кислота, *DL*-5 (4-аминобутил) гидантоин, 5-формил-2-оксивалериановая кислота, *L*-кетоадипиновая кислота, *DL*- и *L*-аминокапролактам, *DL*-аспарагиновая кислота.

Химическое или биологическое получение и подготовка предшественника в этом способе является первой ступенью производства. Сюда же входит подготовка ферментного препарата, с помощью которого будет производиться трансформация предшественника в *L*-лизин. Для этого выращивается соответствующий продуцент ферментов, вернее, получается биомасса микроорганизма, обладающая требуемым комплексом ферментов. Биомасса отделяется от культуральной жидкости и используется либо непосредственно для трансформации, либо клетки предварительно разрушаются (ультразвуком, толуолом, ацетоном, СВЧ, механически и т. д.).

Второй стадией этого способа является собственно процесс трансформации предшественника с помощью ферментов, заключенных в биомассе микроорганизма, в *L*-лизин. В качестве продуцентов нужного комплекса ферментов используются E. coli, artrobacter, Saccharomyces cerevisiae, Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum и др. В Советском Союзе этот способ в промышленном масштабе не используется.

Одноступенчатый способ получения *L*-лизина микробиологическим путем представляет собой выращивание на специально подобранной среде микроорганизма, обладающего способностью к сверхсинтезу *L*-лизина, т. е.

Таблица 50

Вид микроорганизма	Потребность в аминокислотах (нарушен синтез этих аминокислот)	Выход лизина, г/л
Corynebacterium glutamicum		
ATCC 13286	Гомосерин (треонин + метионин)	41
ATCC 21253	Гомосерин + лейцин	52
ATCC 21254	Гомосерин + гистидин	51
ATCC 21255	Гомосерин + изолейцин + + валин	52
Brevibacterium flavum		
H-1013	Гомосерин	43
TM-15-29	Треонин + метионин	23
Brevibacterium lactofermentum ATCC 21086	Треонин + изолейцин + + валин	53
Brevibacterium sp. 22	Гомосерин	27
Corynebacterium glutamicum T-3	Гомосерин + изолейцин + + валин	38

ауксотрофного мутанта с нарушенным синтезом гомосериндегидрогеназы, способного образовывать L-лизина свыше 40 г/л.

Для промышленного получения L-лизина можно также использовать мутанты с нарушенным синтезом гомосеринкиназы, первого фермента треониновой ветви биосинтеза, которые образуют лизина до 15—26 г/л.

Полиауксотрофные мутанты с нарушенным синтезом гомосериндегидрогеназы или гомосеринкиназы и с дополнительно введенным нарушением в цепи синтеза гистидина, изолейцина — валина или лейцина оказываются на 10—20% более продуктивными по L-лизину (табл. 50).

Таким образом, продуцентами L-лизина для его промышленного получения являются исключительно мутанты из группы глутаматсинтезирующих бактерий с нарушенным синтезом гомосериндегидрогеназы и относящиеся к группе коринобактерий.

Учитывая, что одноступенчатый способ получения L-лизина в настоящее время в нашей стране является единственным промышленным способом получения этой аминокислоты, далее подробно остановимся на влиянии условий выращивания продуцентов на процесс биосинтеза микроорганизмами L-лизина.

Большинство продуцентов лизина обладают чрезвычайно неустойчивым аминокислотным обменом, подверженным воздействию внешних условий: состава питательной среды, количества растворенного в среде кислорода, температуры выращивания, pH среды, длительности культивирования, возраста, количества посевного материала и т. д.

Продуценты лизина являются ауксотрофными мутантами с нарушенным биосинтезом ряда аминокислот. Поэтому для обеспечения нормального развития микроорганизмов требуется введение в состав среды биотина и гомосерина. Гомосерин, по данным многих авторов, может быть заменен суммой двух аминокислот — треонином и метионином. Но концентрация треонина в составе среды должна быть точно регламентирована. Как было сказано выше, треонин вместе с лизином являются при их определенном соотношении ингибиторами β-аспартаткиназы, т. е. введение очень малого количества треонина будет тормозить рост

микроорганизма, а избыток его повлечет за собой снижение продуктивности микроорганизма по лизину.

В связи с важной регуляторной функцией треонина в обмене веществ мутантных продуцентов лизина концентрации треонина в среде придается чрезвычайно большое значение. Экспериментально установлено, что наиболее приемлемой концентрацией *L*-треонина для различных мутантов является 0,2 — 0,8 мг/мл.

Есть данные о возможной замене до 50% треонина на *L*-изолейцин, но эта замена для каждого мутанта должна экспериментально обосновываться, так как сравнительно часто это приводит к снижению синтеза (до 30%) лизина.

Необходимым компонентом питательной среды для гомосериновых мутантов является *L*-метионин. Его присутствие в среде обязательно в количестве 0,15 — 0,25 мг/мл, он влияет на рост микроорганизмов, но не участвует в регуляторном акте биосинтеза лизина.

Если используется мутант с нарушенным биосинтезом треонина (треониндефицитный мутант), то для роста продуцента не требуется присутствия в среде метионина, но он оказывает косвенное воздействие на образование лизина, блокируя биосинтез гомосерина, способствует увеличению выхода *L*-лизина.

Если используется в качестве продуцента полиауксотрофный мутант, в состав среды должны быть внесены соответствующие аминокислоты, биосинтез которых нарушен при мутации, но с учетом их влияния не только на рост микроорганизма, но и на аминокислотный обмен их.

Следует также учитывать, что и другие аминокислоты, не участвующие в обмене при биосинтезе лизина, могут оказывать влияние на рост и развитие микроорганизма. Их влияние учитывается каждый раз при работе с новым продуцентом — аминокислотный состав среды должен уточняться экспериментально.

Все продуценты лизина являются биотинзависимыми микроорганизмами. Обычно количество биотина в среде должно быть сравнительно высоким, значительно выше (20 мкг/л), чем это необходимо для нормального роста и развития микробной клетки (4 — 5 мкг/л).

Если же снизить количество биотина до 1 — 2 мкг/л, биосинтез лизина снижается в 20 — 30 раз, но одно-

временно резко повышается биосинтез глутаминовой кислоты. В культуральной жидкости ее накапливается до 20 — 30 г/л.

Высокая концентрация биотина в среде способствует образованию цитоплазматической мембраны, легко проницаемой для основных аминокислот, таких, как лизин, и трудно проницаемой для кислых и нейтральных аминокислот. В результате в такой культуре создаются благоприятные условия для образования повышенного количества внеклеточного лизина за счет высокой концентрации внутриклеточной глутаминовой кислоты, которая является необходимым поставщиком аминных групп при образовании аспарагиновой кислоты и в ряде других превращений цепи образования *L*-лизина.

Помимо гомосерина, треонина и биотина продуценты *L*-лизина, относящиеся к роду Brevibacterium, требуют в питательной среде обязательного присутствия витамина B_1 (тиамина). Если в среде отсутствует тиамин, то культура плохо растет и вместо *L*-лизина преимущественно образуется *L*-аланин.

Источниками биотина и тиамина в промышленных питательных средах обычно являются кукурузный экстракт и свекловичная меласса.

В промышленные среды не добавляют чистые аминокислоты. Их содержание в питательной среде пополняется за счет введения богатых аминокислотами отходов различных производств, а также гидролизатов белоксодержащего сырья: кукурузный и рыбный экстракты; гидролизаты шротов, остающихся после извлечения жиров из арахиса, сои, подсолнечника; гидролизаты отходов молочной промышленности, содержащих казеин, рыбной муки, кормовых дрожжей. Дозировка этого вида сырья определяется, исходя из содержания необходимых для биосинтеза лизина аминокислот. Данные о содержании аминокислот и биотина в некоторых отходах и гидролизатах представлены в табл. 51. Однако данные о содержании свободных аминокислот не всегда дают полное представление о всех формах усваиваемого аминного азота, так как многие продуценты аминокислот обладают пептидазной активностью. Опыт показывает, что максимум накопления *L*-лизина наблюдается при соотношении метионин : треонин : изолейцин, как 1 : 4 : 6, а содержание *L*-треони-

Таблица 51

Аминокислоты	Содержание аминокислот и биотина в некоторых видах сырья, мг% от сухой массы							
	кукурузный экстракт	гидролизат кормовых дрожжей	гидролизат казеина	гидролизат биомассы Brevibact. sp. 22	гидролизат пекарских дрожжей	дрожжевой экстракт	гидролизат арахисовой муки	меласса свекловичная
Лизин	1672,3	2907,9	4631,5	4954,5	5091,9	6087,8	740,3	41,0
Гистидин	1436,5	532,8	1919,8	637,3	1813,8	918,9	1064,5	24,0
Аргинин	1481,6	1491,8	2309,2	1351,3	3076,0	1905,4	3107,0	26,0
Аспарагиновая кислота	2687,8	2597,9	4168,3	1955,8	1280,7	3675,8	3511,1	251,0
Треонин	1405,5	1352,5	6150,5	710,8	2154,3	1871,6	905,3	41,0
Серин	1765,6	1334,5	4554,4	576,0	2154,4	2718,8	1196,0	101,0
Глутаминовая кислота	6495,3	4172,2	13 629,4	4408,8	6651,4	9736,5	6327,6	2534,0
Пролин	3308,5	917,7	5274,6	842,3	1363,0	6952,7	887,8	103,0
Глицин	1817,1	1384,4	1369,4	894,8	1926,7	885,1	556,4	117,0
Аланин	2469,9	1428,9	2227,9	1722,8	2695,1	1344,6	1017,0	118,0
Цистин	26,4	263,9	253,2	927,0	179,5	—	—	-
Валин	1964,1	1618,5	4127,4	1043,8	1945,5	2668,9	1011,3	89,0
Метионин	659,8	18,2	1398,5	—	48,8	176,0	—	13,0
Изолейцин	657,7	1297,7	3125,7	728,8	1679,7	2189,2	874,1	120,0
Лейцин	3538,0	2136,6	5075,4	1251,5	2987,6	4175,6	1688,0	120,0
Тирозин	827,0	610,2	3107,5	462,5	1028,7	110,1	1543,5	89,0
Фенилаланин	1277,5	1220,7	3007,8	566,8	1221,3	2040,5	3044,9	35,0
Биотин *	1963,2	485,5	45,0	1566,5	501,3	39,9	319,0	22,1

* Содержание биотина дается в мкг%.

на должно быть в зависимости от используемого продуцента в интервале от 0,2 до 0,4 мг/мл, или от 20 до 40 мг%.

Для нормального роста, развития культуры и биосинтеза ею *L*-лизина необходимо в состав среды вводить источники углерода. Хорошими источниками углерода являются моно- и дисахариды: глюкоза, фруктоза, сахароза и мальтоза.

Максимальный биосинтез *L*-лизина наблюдается на средах с сахарозой. Лактоза, раффиноза, пентозы практически не могут быть для продуцентов лизина источником углерода, так как почти ими не усваиваются.

Концентрация углевода в среде существенно сказывается на биосинтезе *L*-лизина. С увеличением его концентрации количество лизина в среде возрастает, но не всегда это экономически целесообразно, так как с повышением концентрации, например, сахарозы в среде степень ее использования микроорганизмом падает. Считается, что процесс с наибольшим экономическим эффектом идет, если концентрация усваиваемого углевода находится в пределах 10—12%. Условия биосинтеза улучшаются, если углеводы вводятся дробно, по мере их потребления из среды.

В промышленных условиях в качестве источника углеводов применяют свекловичную или тростниковую мелассу, гидрол (отходы при производстве сахара), различные гидролизаты целлюлозосодержащего сырья (хлопковой шелухи, древесины, кукурузной кочерыжки), а также гидролизаты крахмала. Наилучшие результаты получаются при выращивании продуцентов лизина на мелассе, которая вносится в состав среды в количестве 15—20%. Недостатком данного сырья являются большие различия от партии к партии, которые могут приводить к существенному снижению выхода лизина. В среднем выход лизина на мелассах составляет 25% от введенного в процесс сахара, а для некоторых мутантов он может достигать 30—33%.

В настоящее время перспективным является использование в качестве источника углерода нормальных углеводородов (газообразные, жидкие и твердые) и производных природного газа этилена (уксусная кислота, этанол и этиленгликоль). При таком источнике уг-

лерода используются также гомосериновые и треониновые мутанты специальных видов микроорганизмов, усваивающих углеводороды. Среди продуцентов можно назвать следующие микроорганизмы: Br. ketoglutamicus, Arthrobacter parafineus, Corynebacterium hydrocarbolastus, Nocardia sp. и др. На углеводородах и их окисленных производных микроорганизмы накапливают от 3 до 34 г лизина на 1 л культуральной жидкости. Углеводороды могут быть использованы в качестве единственного источника углерода или же в сочетании с углеводами или с окисленными формами углеводородов. Считается, что самым перспективным является ацетат, на котором большинство известных продуцентов, а также ряд специальных видов микроорганизмов хорошо растут и образуют лизина до 20—90 г/л.

При использовании сред с ацетатом снижается потребность микроорганизмов в биотине до 1 мкг на 1 л питательной среды. Но при выращивании на ацетатных средах есть некоторые сложности. Ацетат угнетает биосинтез ферментов цикла трикарбоновых кислот, и потому его повышенное содержание в среде вызывает снижение лизинообразования у микроорганизмов. Предельно допустимое содержание ацетата в среде не должно превышать 2%. Поэтому при культивировании необходимо осуществлять дробную подачу уксусной кислоты или ее солей. Часто используют и смесь кислоты и ацетата натрия или кислоты и ацетата аммония в определенных соотношениях, устанавливаемых для каждого штамма экспериментально, но при всех условиях концентрация ионов ацетата в пересчете на уксусную кислоту не должна превышать 1,5—2,0%. Введение в среду небольшого количества сахара, например глюкозы от 1 до 6% (к ацетату), способствует повышению выхода лизина на 30—50%. Выход лизина в пересчете на потребленный ацетат составляет 25—27%. На этой среде также требуется соблюдение определенного соотношения дефицитных аминокислот, например при культивировании Brevibacterium sp. 22 Л соотношение треонина к метионину 3:1, а содержание тиаминхлорида — 0,04 мг/л и биотина — 0,05 мг/л.

Для примера рассмотрим процесс накопления лизина при выращивании Br. sp. 22 Л на ацетатной среде

следующего состава (в %): ацетат аммония — 1,5; глюкоза — 1,0; калий фосфорнокислый однозамещенный — 0,02; $MgSO_4$ — 0,04; мочевина — 0,2; гидролизат соевой муки — 1,5 (по сухим веществам); NH_4SO_4 — 3; необходимые ростовые вещества и аминокислоты.

Уксусная кислота подается непрерывно в виде смеси 1М уксусной кислоты и 0,25М ацетата аммония с та-

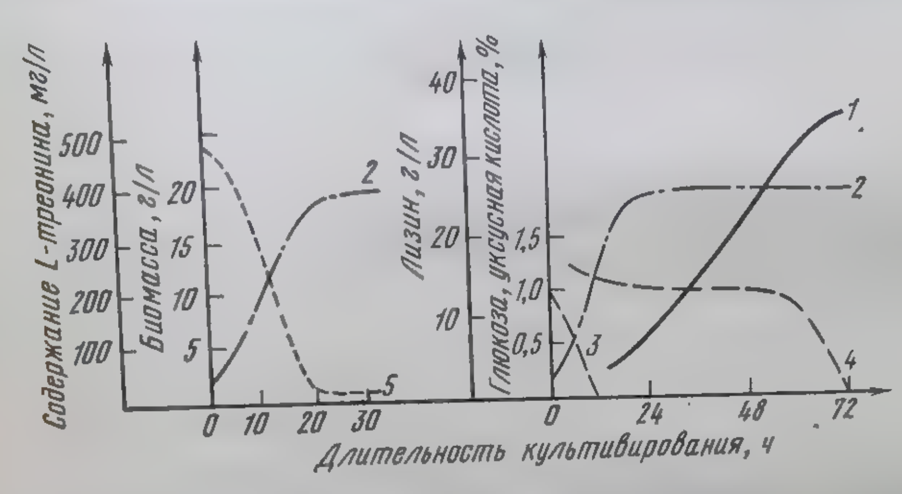


Рис. 107. Динамика накопления *L*-лизина (*1*), биомассы (*2*) и изменения компонентов питательной среды (*3* — глюкоза; *4* — уксусная кислота; *5* — *L*-треонин при культивировании Brevibacterium 22Л на средах, содержащих уксусную кислоту).

кой скоростью, чтобы в пересчете на уксусную кислоту ее концентрация не превышала 1,2—1,5%. На рис. 107 показан характер накопления лизина и биомассы и потребления источников углерода и *L*-треонина в процессе ферментации. Из рисунка прежде всего видна взаимосвязь биосинтеза лизина с потреблением *L*-треонина. Совершенно очевидно также, что из смеси источников углерода первоначально потребляется глюкоза, что соответствует наибольшей скорости роста биомассы продуцента, а затем начинается потребление ацетата и накопление в культуральной жидкости лизина, количество которого к 72-му часу роста составляет 34,0 г/л.

В литературе есть указания, что лизин микробиологическим одноступенчатым способом можно получать, используя в качестве источника углерода этиловый спирт, концентрация которого в среде не должна превышать 2%.

Для этой цели используются специально полученные мутанты, относящиеся к той же группе микроорганизмов: Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum, Corynebacterium acetoacidophilum. Эти мутанты обладают АЕЦ-резистентностью и недостаточностью по серину, аланину, пролину, никотинамину, пантотеновой кислоте и гуанину. Почему именно такого рода мутанты способны расти на этиловом спирте и образовывать лизина до 50—60 г/л, пока не ясно.

Таким образом, в зависимости от используемого продуцента могут применяться в промышленных условиях самые разные источники углерода: моно- и дисахариды, гидролизаты полисахаридов, различные углеводороды и некоторые их окисленные формы. Количество источника углерода, технология его внесения в среду и степень его использования на биосинтез лизина зависят от физиологических особенностей данного продуцента и от адаптации его к данному субстрату.

Источник азота обычно вносится в состав среды либо в виде солей аммония, или в виде мочевины. Однако для каждого промышленного штамма преимущества той или другой соли определяются экспериментально. На рис. 108 представлены данные по влиянию концентрации источника аммонийного азота на биосинтез лизина тремя различными культурами. Графики наглядно показывают, что, например, для Brevibacterium sp. 22 наибольшее лизинообразование происходит при использовании 1,5—2,0% NH_4Cl или $(NH_4)_2SO_4$. Несколько иначе ведут себя две другие культуры, но во всех трех вариантах культур нет совпадения ни в солях, ни в дозировках, ни в величинах максимального накопления лизина.

Многие продуценты лизина обладают уреазной активностью и потому могут использовать мочевину в качестве источника аммонийного азота.

Большое значение имеет также соотношение углерода и азота в среде. Оптимальное соотношение для каждого штамма — свое, и отклонение от него приводит к нарушению биосинтеза лизина. Например, для Corynebacterium glutamicum 95 это соотношение должно быть C:N=11:1, если же изменить его в сторону увеличения азота, то вместо лизина будет накапливаться аланин.

Если в среде мало азота, то снижается выход лизина, а при низкой аэрации образуется молочная кислота.

В питательной среде источниками азота могут быть аминокислоты, мочевина или соли аммония.

Для продуцентов лизина необходимо в состав среды вводить фосфор в виде калиевых солей фосфорной кислоты, но количество фосфора в среде должно быть

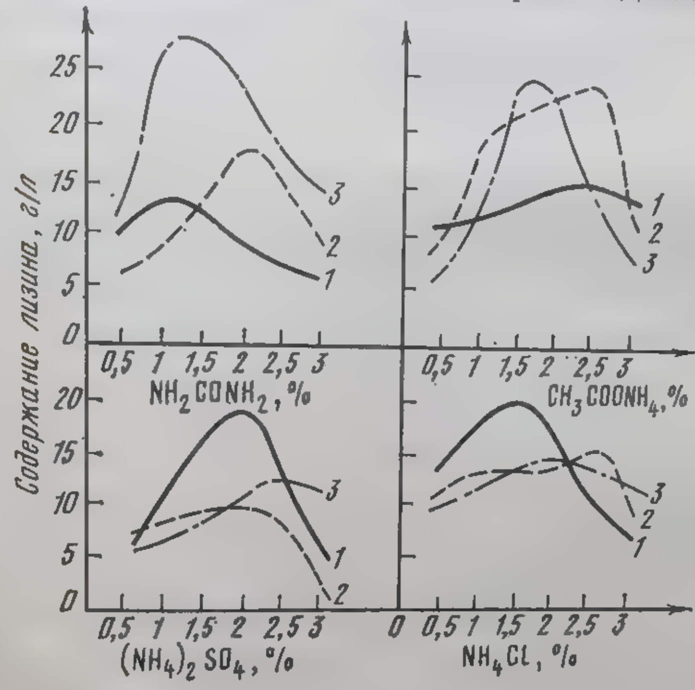


Рис. 108. Влияние источника азота на биосинтез лизина некоторыми бактериальными культурами:

1 — Brevibacterium 22; *2* — Micrococcaceae E; *3* — Micrococcaceae 28.

Исследование проводилось на среде, содержащей (в %): мелассы — 15; кукурузного экстракта — 2; мела — 1; KH_2PO_4 — 0,65; K_2HPO_4 — 0,05; pH среды 7,0.

регламентировано (8—20 мг%), 10-кратное повышение его концентрации до 160—200 мг% в среде приводит для Coryn. glutamicum к снижению синтеза лизина почти наполовину, поэтому фосфорнокислый аммоний нельзя использовать в качестве источника азота.

Продуценты лизина испытывают потребность в ряде макро- и микроэлементов: магнии, железе, меди, марганце. Магний вводится обычно в виде соли серной кислоты в количестве от 0,03 до 0,05%, остальные соли вносят в среду также в виде сульфатов, но их количество значительно меньше — от 0,0008 до 0,001%. Обычно железо, медь и марганец специально в среды

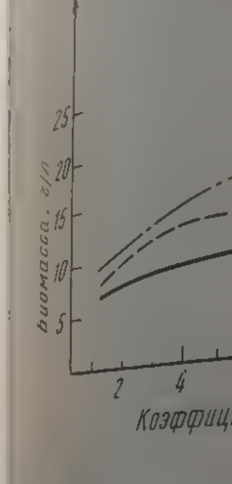
не вносят, они есть в достаточных количествах в кукурузном экстракте, мелассе и других компонентах среды.

Условия культивирования определяются pH среды, степенью аэрации среды, длительностью и температурой ферментации, возрастом и дозой посевного материала. Все эти факторы оказывают существенное влияние на биосинтез лизина.

Большинство продуцентов лизина являются мезофильными микроорганизмами, имеющими оптимум роста, развития и биосинтеза лизина при температуре 28—30° С. Отклонения от этой температуры нежелательны. Повышение температуры на 5—7° С от оптимальной приводит к быстрому автолизу культуры, и в среде накапливается значительно меньше лизина. Понижение температуры на 4—6° С также невыгодно, так как культивирование резко затягивается на 12—20 ч, хотя выход лизина при этом почти не падает.

Уровень pH среды — это очень ответственный параметр процесса. Как известно, продуцентами являются бактериальные штаммы, и потому в большинстве случаев оптимум pH для культивирования лежит в области, близкой к нейтральной или слабощелочной. Для штаммов, используемых в нашей стране, наилучшие результаты по биосинтезу лизина получаются, если pH среды поддерживается около 7,2±0,2, а для Brevibacterium 22 и Brevibacterium flavum — в интервале от 7 до 7,6. Для всех известных продуцентов лизина pH, обеспечивающей максимальное накопление лизина и рост культуры, лежит в пределах от 6 до 8,5.

Снабжение растущей культуры кислородом является ответственным и важным фактором, влияющим на рост микроорганизма и образование им лизина. Кислород, используемый бактериальной клеткой, должен быть растворен в питательной среде. Для увеличения растворимости кислорода осуществляют барботирование среды воздухом с одновременным ее перемешиванием. В зависимости от систем и конструкций аэрирующих и перемешивающих устройств количество растворенного кислорода в среде будет различным. Для того чтобы сопоставить условия биосинтеза целевого продукта с количеством растворенного кислорода, необходимо хотя бы эту зависимость проследить при различных значениях сульфитного числа, которое может быть пере-



считано на количество растворенного кислорода (в г O_2 на 1 л среды в час). Различные продуценты лизина испытывают неодинаковую потребность в кислороде, но, учитывая, что процесс биосинтеза лизина связан с высокой активностью дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот и с активностью ферментов глиоксалатного цикла, все они нуждаются в интенсивной аэрации. Недос-

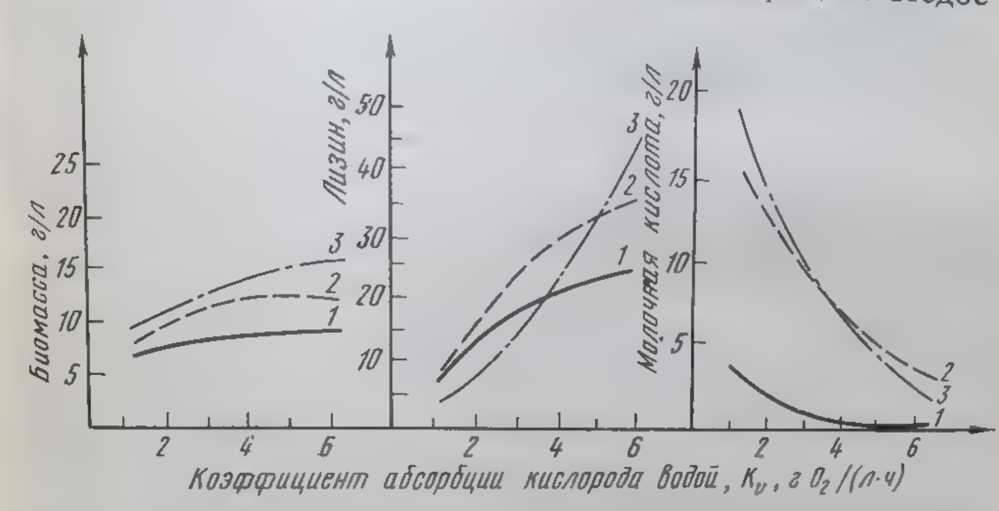


Рис. 109. Влияние состава среды и аэрации на образование биомассы, лизина и молочной кислоты при культивировании Corynebacterium glutamicum Т-3, на субстрате различного состава:

1 — 15% мелассы; *2* — 20% мелассы; *3* — 28% мелассы.

таточная аэрация приводит к усилению образования аланина и молочной кислоты за счет снижения выхода лизина, что крайне нежелательно. Но в то же время степень аэрации должна быть вполне определенной, так как интенсивная аэрация приводит к усиленному росту самой культуры, выход же лизина начинает падать так же, как и при недостаточной аэрации (рис. 109).

В процессе культивирования концентрация растворенного кислорода контролируется по парциальному давлению кислорода (p_{O_2}). Независимо от величины K_v в данном аппарате характер изменения p_{O_2} в культуральной жидкости обычно носит однотипный характер, но глубина снижения величины p_{O_2} в момент наибольшей скорости образования биомассы продуцента будет различная (рис. 110, *а*), что в свою очередь существенно влияет на образование лизина (рис.110, *б*).

25—212

По данным Зайцевой и др., для того чтобы обеспечить максимальный выход лизина, необходимо в момент критического снижения парциального давления кислорода (в период от 16 до 20 ч роста культуры) подать в культуру такое количество воздуха, чтобы его величина не падала ниже 20—30% от полного насыщения. Аэрирующие и перемешивающие устройства должны в ферментаторах работать с учетом этого положения. Оптимальные значения K_v и уровня p_{O_2} в среде для каждого организма могут быть установлены только экспериментальным путем с учетом характера питательной среды и применяемого пеногасителя.

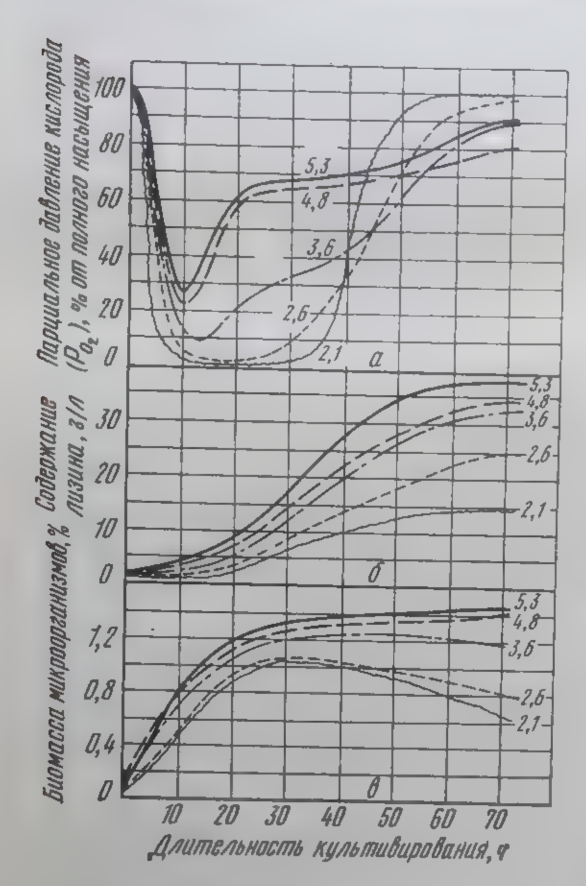


Рис. 110. Динамика изменения парциального давления кислорода (*а*), образования биомассы (*в*) и накопления лизина (*б*) при культивировании Corynebacterium glutamicum Т-3 при различных значениях сульфитных чисел (K_v) в ферментаторе (на кривых цифра указывает величину сульфитного числа в ферментаторе).

Исходную культуру продуцента хранят и поддерживают так же, как и любой другой микроорганизм. Особого внимания требуют продуценты лизина в связи с тем, что они подвержены лизису под действием фагов. В настоящее время из культуральной жидкости, воздуха, почвы территорий заводов, производящих лизин, выделено до 50 различных фагов. Все фаги поражают микроорганизмы, относящиеся в Brevibacterium, для Corynebacterium пока не обнаружено фагов. От фагов очень сложно избавиться, поэтому более рационально использовать фагоустойчи-

вые микроорганизмы для биосинтеза лизина. При отборе продуцентов в группе Brevibacterium необходимо учитывать их стойкость к антибиотикам, особенно к стрептомицину, так как устойчивые к этому соединению микроорганизмы устойчивы и к поражению фагами. Исходную чистую коллекционную культуру хранят, как правило, в ампулах в лиофильно высушенном состоянии. При начале производства исходную культуру высевают в чашки

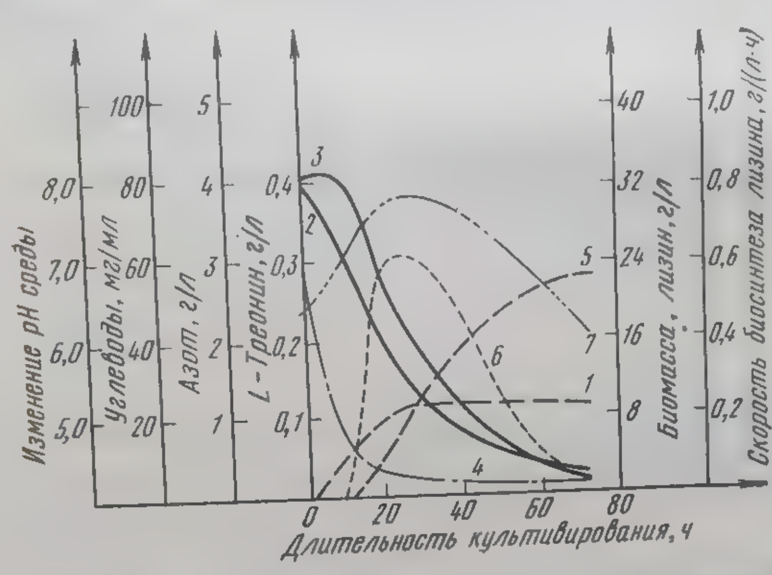


Рис. 111. Динамика развития продуцента лизина и изменения состава культуральной жидкости в ходе периодического выращивания Micrococcus glutamicus 95:

1 — биомасса; 2 — углеводы; 3 — азот (NH_4); 4 — треонин; 5 — лизин; 6 — скорость биосинтеза лизина; 7 — pH.

Петри на агар Хоттингера, затем в пробирки, колбы и в инокулятор. Посевной материал обычно используется в возрасте 16—24 ч и имеет титр (2÷4) 10^9 кл на 1 мл культуры. Дозировка посевного материала может быть различной — от 1 до 5%. Чем больше доза посевного материала, тем выше экономический коэффициент, короче лаг-фаза и меньше длительность выращивания производственной культуры.

У продуцентов лизина накопление биомассы и лизина не совпадает по времени. По данным Зайцевой, биомасса накапливается в первые 12—18 ч, а целевой продукт — лизин — начинает образовываться в заметных количествах лишь тогда, когда рост биомассы замедляется (рис. 111). В период отсутствия биосинтеза ли-

зина (первые 12—18 ч) клетки продуцента крупные; когда же начинается образование лизина, они заметно уменьшаются. Наиболее характерным признаком начала биосинтеза лизина является почти полное потребление из среды треонина. Наибольшая скорость биосинтеза лизина для культуры Coryn. glutamicum 95 наблюдается на 20—30-м часу роста и достигает 0,65 г/(л·ч) (рис. 111, кривая 6), что соответствует фазе замедления роста культуры. Для культуры Brevibacterium sp. 22Л двухфазность тоже имеет место, но она выражена менее четко, чем у культуры Coryn. glutamicum 95 (рис. 112, кривые *1* и *2*).

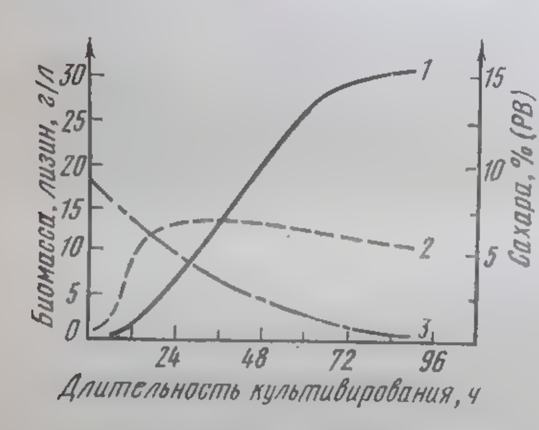


Рис. 112. Динамика накопления лизина (*1*), роста микроорганизма (*2*) и потребления углеводов (*3*) в ходе периодического культивирования Brevibacterium sp. 22Л.

Изменения в составе среды и биосинтезе отдельных метаболитов для этих двух культур имеют много общего, но есть и некоторые различия. Длительность культивирования Coryn. glutamicum и Brevibacterium 22Л практически одинакова (68—72 ч), количество образующего лизина также очень близко и зависит от состава среды, уровня дефицитных аминокислот, аэрации и т. д., оно колеблется от 25 до 50 г/л.

§ 3. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОИЗВОДСТВА ЛИЗИНА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПУТЕМ

В отличие от производства кормовых дрожжей промышленное получение лизина и других аминокислот осуществляется в строго асептических условиях, на стерильных питательных средах с использованием чистой культуры продуцента. Принципиальная технологическая последовательность процесса получения лизина следующая: приготовление посевного материала; приготовление и стерилизация питательной среды, всей аппаратуры и коммуникаций; культивирование продуцента в промышленных ферментаторах (ферментация); выделение целевого продукта (*L*-лизина).

Приготовление посевного материала. Посевная культура продуцента может быть приготовлена двумя способами: периодически и непрерывно. В настоящее время на биохимических заводах, выпускающих лизин, приготовление посевной культуры преимущественно ведется периодическим методом.

Свободная от фага и посторонней микрофлоры исходная культура продуцента с чашек Петри с агаром Хоттингера пересевается в пробирки с 2%-ным мясопептонным агаром и выращивается в течение суток при температуре 29—30° С. На основе этой культуры готовят на стерильной водопроводной воде суспензию плотностью 10^8 клеток на 1 мл (ориентировочно 8—10 мл воды на 1 пробирку). Этой суспензией засевают стерильную питательную среду в качалочных колбах. Для получения посевного материала используют среды различного состава, чаще всего в среду входят меласса (3—5%), кукурузный экстракт (2,5—3,0%) и поваренная соль (до 0,4%), среда подтитровывается 20%-ным раствором едкого натра до величины pH 7—7,2. В качалочные колбы объемом 750 мл заливают по 100—120 мл среды и стерилизуют в автоклаве. После охлаждения среда в каждой колбе засевается 2 мл посевной суспензии и культура выращивается в течение суток на качалках (180—200 об/мин) при температуре 29—30° С — это так называемые маточные посевные колбы. Затем производится засев посевных колб со средой того же состава, засев осуществляется из расчета 5% из маточной односуточной культуры. Посевные колбы также выращиваются на качалках сутки при температуре 30° С. Посевными колбами засевается первый инокулятор из расчета 0,05—0,1% по объему, где культура выращивается сутки при аэрации и перемешивании при 29—30° С. В инокуляторе состав среды может быть таким же или другим, более близким к производственной питательной среде. Состав среды для каждого продуцента устанавливается экспериментально.

Посевная среда обычно стерилизуется в посевном аппарате. Если производственные ферментаторы очень большой емкости или производительность завода велика, то может быть еще одна ступень инокуляторов, объемы которых больше предыдущих, так как количество

задаваемой в аппарат посевной культуры сравнительно высоко - от 1 до 5% по объему, а для ряда продуцентов может быть 20—30%. Следует помнить, что при периодическом способе получения посевной культуры независимо от количества стадий длительность выращивания продуцента на каждой стадии будет 16—24 ч.

В настоящее время предложен и разработан для производства L-лизина непрерывный способ получения посевного материала. Принципиальная схема этого процесса представлена на рис. 113. Обновление исходной культуры и первые этапы размножения культуры осуществляются в лабораторных условиях, но вместо качалочных колб выращивание культуры проводится на специальном лабораторном стенде в небольших аппаратах с автоматическим регулированием заданных параметров, что позволяет значительно увеличить количество получаемой культуры и сократить время выращивания производственной культуры за счет увеличения дозы посевного материала (рис. 114).

В инокулятор загружают стерильную среду (1/3 объема) и задают с лабораторного стенда 5—6% посев-

Рис. 113. Принципиальная схема получения посевного материала Brevibacterium sp. 22Л непрерывным способом:

1 — колбы; *2* — ферментационный стенд; *3* — инокуляторы; *4* — сборники стерильной среды; *5* — посевные ферментаторы; *6* — сборники инокулята.

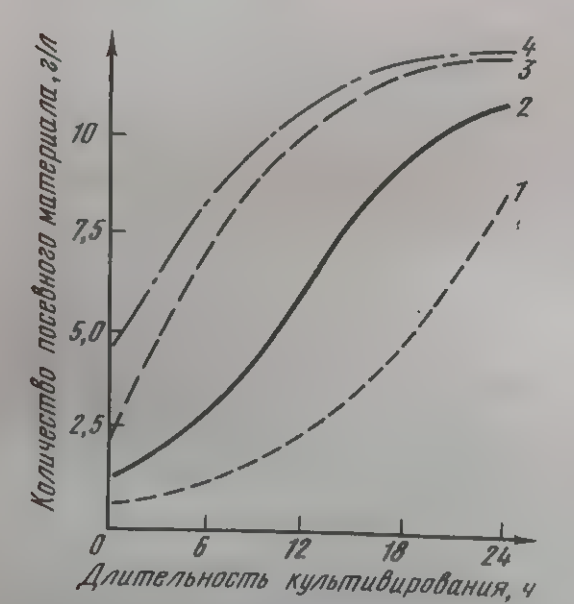


Рис. 114. Кинетика образования биомассы продуцента лизина в зависимости от количества посевного материала (в %):

1 — 5; *2* — 15; *3* — 30; *4* — 50.

ной культуры, подключают инокуляторы к сборнику со стерильной питательной средой и при интенсивной аэрации и перемешивании среды осуществляют выращивание до тех пор, пока среда с культурой не займет $^1/_2$ от полного объема инокулятора. Затем начинают подачу культуральной жидкости из инокулятора в посевной ферментатор, туда же поступает свежая питательная среда. Скорость подачи среды и культуры зависит от физиологических особенностей продуцента. Когда посевной ферментатор будет заполнен на 0,6 (полное заполнение), подачу посевной культуры из инокулятора переключают на следующий посевной ферментатор и т. д. Из посевного ферментатора готовый посевной материал направляется в производство или же в предварительно простерилизованные сборники ($V=25\div35$ м^3).

Такая схема позволяет использовать в производстве до 30% посевного материала. По этой схеме из инокулятора поток культуры идет в посевной аппарат только во время загрузки. Один из них поочередно выполняет функции промежуточной емкости для создания непрерывности при поочередной подготовке и стерилизации аппаратуры. Когда схема работает на установившемся режиме, то 3 посевных ферментатора находятся в стадии выращивания культуры, а четвертый — в состоянии подготовки. Межстерилизационный период для аппаратуры, предназначенной для производства посевной культуры — продуцентов аминокислот, составляет 72 ч. Таких линий на производстве может быть несколько в зависимости от производительности предприятия и количества задаваемого посевного материала. Но используя непрерывный способ приготовления посевного материала, следует помнить, что при длительной работе батареи возможно возникновение ревертантов и утрата свойств продуцентом. Наблюдение за культурой здесь особенно важно.

Инокуляторы или посевные ферментаторы имеют сравнительно простые конструкции. Главное требование — это минимальное количество штуцеров, смотровых окон, люков, отсутствие вращающихся деталей, надежные устройства для герметизации ферментатора. Перспективны посевные ферментаторы с пневматическим перемешиванием, где диспергирование достигается при вве-

дении в ферментатор воздуха через сопло с коническим расширением. Диаметр отверстия сопла от 1 мм (лабораторный инокулятор) до 10 мм в промышленных инокуляторах. Конструкция такого посевного ферментатора приведена на рис. 115. При использовании этого аппарата можно обойтись без химического пеногасителя.

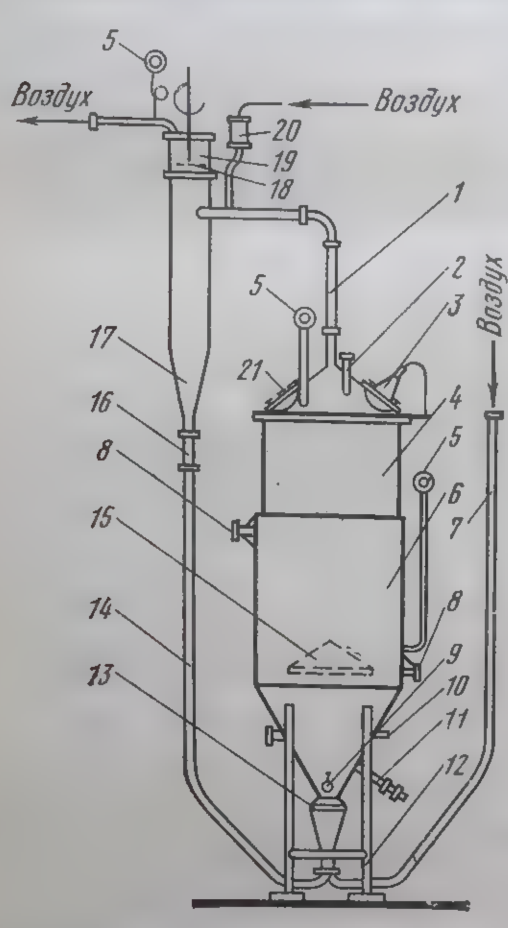


Рис. 115. Сопло-конусный ферментатор ФСКА-3 с системой циркуляции и пеногашения:

1 — ввод пены с воздухом в циклон; *2* — посевной штуцер; *3* — светильник; *4* — корпус ферментатора; *5* — манометр; *6* — пароводяная рубашка; *7* — подвод воздуха; *8* — штуцер для воды, пара и конденсата; *9* — пробоотборник; *10*, *11* — штуцера для термометра и отвода культуральной жидкости; *12* — опора аппарата; *13* — аэратор; *14* — обратная труба; *15* — конический барботер; *16*, *21* — смотровые окна; *17* — циклон; *18* — лопасти пеногасителя; *19* — стеклянная часть циклона; *20* — подача питательной среды.

Готовая посевная культура независимо от способа ее выращивания должна быть свободна от фага (для продуцентов из рода Brevibacterium), посторонней микрофлоры и иметь титр около 10^9 клеток на 1 мл.

Приготовление и стерилизация питательной среды, аппаратов и коммуникаций. Питательная среда для выращивания продуцентов лизина состоит из мелассы, кукурузного экстракта или другого источника ростовых веществ, мела и пеногасителя. Питательная среда готовится и стерилизуется в две стадии с учетом свойств компонентов, входящих в ее состав. Стадия подготовки и стерилизация среды состоят из смешивания компонентов питательной среды в определенной пропорции с помощью специальных дозаторов в реакторе, растворения солей при перемешивании, нагрева до температуры стерилизации, выдержки при этой температуре и охлаждения

до температуры, при которой проводится культивирование продуцента лизина.

В производстве лизина используется меласса, содержащая термолабильный компонент — сахарозу. Поэтому ее стерилизуют отдельно. В реактор, снабженный мешалкой, подают мелассу и нагревают ее при постоянном размешивании до температуры 80° С, смешивая ее с водой согласно имеющейся рецептуре, затем ее быстро разогревают глухим паром до температуры 120—122° С в специальном аппарате и выдерживают при этой температуре определенное время, необходимое для полной гибели всей микрофлоры. Остальные компоненты среды также в реакторе с перемешиванием смешивают и растворяют в воде с подогревом, нагревают в специальном аппарате до температуры стерилизации, выдерживают при ней и охлаждают. Длительность стерилизации значительно меньше, но температура выше. В целом же схема приготовления среды и стерилизации ее аналогична той, что приводилась ранее в части II.

Пеногаситель часто стерилизуется отдельно, особенно в том случае, когда им является масло или жир. Режимы стерилизации (температура и длительность) при обработке пеногасителя более жесткие, чем это принято для стерилизации любых питательных сред.

Процесс получения лизина требует строгих асептических условий, и поэтому особое внимание уделяется стерилизации не только среды, но и всех реакторов, коммуникаций, подаваемого воздуха. При стерилизации аппаратуры режимы стерилизации зависят главным образом от материала, из которого изготовлены его части. Самая эффективная обработка аппаратуры и коммуникаций — под давлением острым паром при температурах около 135—140° С. Но отдельные блоки аппаратов, в том числе датчики измерительных приборов, не выдерживают таких условий стерилизации, и потому в этих случаях могут применяться «холодные» способы стерилизации. Для такой обработки могут быть использованы бактерицидные газы (этилен) и растворы химических реагентов (формалина, смеси цитилпиридинового бромида и этанолмеркурихлорида в соотношении 2 : 1, различные производные фенола и их смеси, аммонийные соли первичных и вторичных алкилсульфатов, хлорсодержащие соединения, β-пропиоллактон и т. д.). После «холодной»

стерилизации остатки химических реагентов должны быть удалены промывкой стерильной водой.

Степень стерильности среды, оборудования и коммуникаций может быть проверена. Простерилизованную среду или смывы, произведенные стерильной водой с внутренних поверхностей аппаратов и трубопроводов, высевают на агаризованные или жидкие питательные среды и инкубируют в термостате сутки. Если среды остаются стерильными, то стерилизация проведена качественно. Такой анализ проводится при пуске завода, в случае появления инфекции и периодически в профилактических целях.

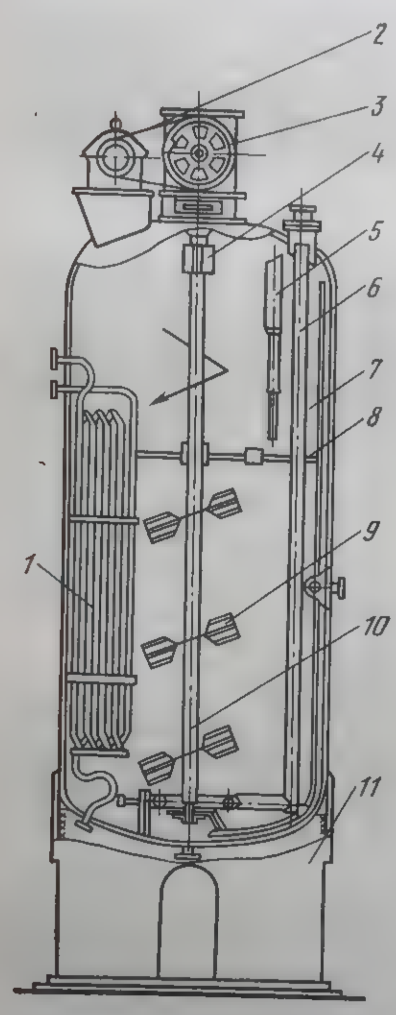


Рис. 116. Ферментатор вместимостью 50 м³:

1 — теплообменник; 2 — мотор; 3 — привод мешалки; 4 — соединительная муфта вала; 5 — гильза для термометра; 6 — барботер; 7 — корпус аппарата; 8 — растяжка для центровки вала; 9 — лопасти мешалки; 10 — мешалка; 11 — опора аппарата.

Культивирование продуцента в промышленных ферментаторах. Выращивание производственной культуры продуцента лизина осуществляется в подавляющем большинстве случаев периодическим способом в ферментаторах. В отличие от аппаратов, используемых при производстве кормовых дрожжей, эти реакторы сравнительно меньших габаритов и имеют объемы 50, 63 и 100 м³. Они все предназначены для выращивания культуры в асептических условиях со строгим соблюдением герметизации процесса. Ферментаторы снабжены необходимыми коммуникациями, системой подачи стерильного пеногасителя, охлаждающими теплообменными устройствами и устройствами для перемешивания и введения в питательную среду стерильного воздуха, дополни-

тельных питательных ингредиентов, а также растворов кислот или щелочей для поддержания pH среды на заданном уровне. На рис. 116 представлен общий вид ферментатора для выращивания продуцента в асептических условиях.

Стерильная среда в ферментатор может вводиться при температуре, близкой к температуре выращивания продуцента (32—35° С), или с температурой около 80° С. В этом случае для окончательного охлаждения аппарата и среды используются теплообменные устройства самого ферментатора.

Когда температура среды достигает оптимальной, из посевного ферментатора вводят посевной материал и тут же начинают аэрировать содержимое ферментатора. Коэффициент заполнения аппарата 0,65—0,75 в зависимости от степени пенообразования в данных условиях культивирования.

В ферментаторе устанавливают определенный режим культивирования в зависимости от особенностей продуцента. Для продуцентов лизина длительность ферментации 58—72 ч.

В первые сутки микроорганизмы ассимилируют приблизительно 25% от общего азота среды, углеводов и почти все аминокислоты, накапливается почти вся биомасса. Вторая стадия роста культуры сопровождается резким замедлением накопления биомассы и самыми высокими скоростями биосинтеза лизина. Питательная среда очень сильно истощается, изменяется pH среды. В это время целесообразно проводить подтитровывание среды 25%-ным раствором аммиака или 15%-ным раствором NaOH с целью стабилизации pH и осуществлять дополнительное введение питательных веществ (подпитка). Последняя стадия выращивания продуцента лизина характеризуется некоторой убылью биомассы за счет небольшого автолиза клеток и резким снижением скорости накопления лизина.

Как уже говорилось выше, на биосинтез лизина существенное влияние оказывают аэрация и перемешивание. Поэтому на всех стадиях процесса все параметры культивирования строго регламентируются и контролируются (температура, pH, изменение основных компонентов среды, накопление лизина, аэрация, перемешивание и т. д.).

При периодическом способе культивирования продуцента через 58—72 ч концентрация лизина в культуральной жидкости достигает 25—40 г/л, биомассы по сухой массе накапливается 10—15 г/л, экономический коэффициент по потреблению сахара в пересчете на лизин составляет 25—35%.

В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР под руководством академика Бекера разработаны основы непрерывного культивирования микроорганизма — продуцента лизина Brevibacterium sp. 22Л. По методу хемостата равновесное состояние системы устанавливается при скорости протока $0{,}05 \leqslant D \leqslant 0{,}20$ ч$^{-1}$.

В отбираемой культуральной жидкости концентрация лизина 6—8 г/л, а содержание биомассы — 8 г/л. Биосинтетическая способность культуры по лизину возрастает при непрерывном культивировании на 20—25%.

Учитывая, что синтез лизина начинается после того, как сформируется биомасса продуцента, целесообразно проводить процесс в трехступенчатой системе аппаратов, когда каждый из них работает в своем режиме и отбор культуральной жидкости идет только из третьего аппарата. В этом случае можно достичь съем лизина до 27—30 г/л (табл. 52).

Таблица 52

Показатели	Ступени (ферментаторы)		
	I	II	III
Содержание биомассы, г/л	9,0±0,7	15,4±0,7	13,7±1,1
Концентрация *L*-лизина в виде монохлорида, г/л	5,4±0,5	15,1±1,1	24,7±2,3
Концентрация остаточных сахаров, %	5,6±0,5	3,0±0,3	1,1±0,3
Коэффициент разбавления, ч$^{-1}$	0,15	0,10	0,08
Интенсивность аэрации, г O_2/(л·ч)	4	2	2

Можно повысить в культуральной жидкости содержание лизина, если по мере исчерпания углеводов и азота в среде дополнительно вводить в процесс небольшие порции питательных веществ. Это приводит к активизации биосинтетической деятельности микроорганизмов. На мелассной среде при дробной подпитке содержание лизина может достигать 60 г/л.

Готовая культуральная жидкость помимо лизина содержит биомассу продуцента, остатки непотребленных питательных веществ среды, продукта обмена веществ.

Выделение целевого продукта (*L*-лизина). В зависимости от последующего назначения препарата можно на основе культуральной жидкости получить технические препараты в виде жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) и сухого кормового концентрата лизина (ККЛ), а также кристаллический лизин. Для каждого из этих продуктов существует своя технология.

Для кормовых целей целесообразнее получать технические препараты ЖКЛ и ККЛ, так как они содержат помимо лизина значительное количество других очень важных для животного организма соединений, в частности витамины: рибофлавин, пантотеновую кислоту, фолевую кислоту, никотинамид и др.

Технические препараты лизина получают на основе всей суммы веществ, присутствующих в культуральной жидкости, включая биомассу продуцента и твердые нерастворимые частицы среды. Так как культуральная жидкость имеет сравнительно низкое содержание сухих веществ (10—13%) и не обладает стабильностью при хранении, поэтому необходимо увеличить концентрацию сухих веществ методом выпаривания или высушивания. Готовая культуральная жидкость перед концентрированием должна содержать минимальное количество редуцирующих сахаров, так как они могут образовывать в процессе концентрирования с участием ε-аминогруппы лизина соединения, не усваиваемые животными, т. е. происходит безвозвратная потеря целевого продукта.

Для стабилизации лизина культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до pH 5,0 и добавляют 25%-ный раствор метабисульфита натрия в количестве 0,4%. Далее стабилизированную культуральную жидкость выпаривают в вакуум-выпарной установке до концентрации сухих веществ 35—40%. Потери лизина на этой операции составляют от 5 до 15%. Вязкость ЖКЛ $0{,}648\times10^{-3}$ кг/(м·с), замерзает он при —18° С, удельная масса 1,150—1,300, pH 4,5—6,0.

Жидкий концентрат лизина (ЖКЛ) хорошо сохраняется в течение 3—4 мес. Считается, что он обладает большей биологической ценностью, чем сухой ККЛ. Для получения сухого концентрата (ККЛ) жидкий концентрат

высушивают на распылительных сушилках до влажности 5—6%. Такой концентрат (ККЛ) содержит до 15—20% лизина в виде монохлоргидрата, около 15—17% белка, до 14% других аминокислот, 10—13% бетаина и около 20—25% зольных веществ. Но сухой концентрат (ККЛ), получаемый высушиванием стабилизированной и сконцентрированной культуральной жидкости, имеет недостаток, он очень гигроскопичен (его гигроскопическая точка при 20° С равна 20—22% относительной влажности воздуха) и при хранении слеживается крупными комками, которые затрудняют его дальнейшее продуктивное использование и при приготовлении комбикормов, и непосредственно на животноводческих фермах. Есть несколько способов ликвидации этого недостатка. По-видимому, большая гигроскопичность сухого препарата связана с высоким содержанием сахаров и органических кислот. Их процентное содержание можно понизить, если ввести в культуральную жидкость наполнители, например костяную муку, окись кальция, бентонит, пшеничные отруби, и вместе с ними высушить, тогда получается сыпучий менее гигроскопичный продукт. На Обольском биохимическом заводе к сконцентрированной до 35—40% культуральной жидкости добавляют отруби из такого расчета, чтобы влажность была около 70% и получалась масса, которую можно было бы формовать в гранулы. Гранулы высушиваются методом конвективной сушки. Готовый препарат ККЛ содержит до 7—10% лизина, сыпуч и негигроскопичен.

Известен метод выращивания на готовой культуральной жидкости, содержащей лизин, специальных видов дрожжей, усваивающих углеводы и органические кислоты. Из культуральной жидкости исчезают нежелательные компоненты (сахара и органические кислоты), и она дополнительно обогащается кормовым белком (дрожжи).

ККЛ получается при такой технологии менее гигроскопичным и более сыпучим. Жидкий и сухой концентрат лизина приблизительно одинаков по своему составу, если он приготовлен без наполнителя. Если же дан наполнитель, то к сумме сухих веществ культуральной жидкости прибавляются еще сухие вещества наполнителя.

Химический состав кормового препарата лизина сложен и содержит очень большое количество самых различных соединений:

Аминокислоты	Содержание в препарате, %
Лизин	15,0—20,0
Глутаминовая кислота	2,5—3,7
Валин	1,2—4,8
Аланин	1,3—3,1
Аспарагиновая кислота	0,8—1,4
Лейцин	0,6—1,1
Пролин	0,3—2,8
Глицин	0,6—0,9
Аргинин	0,3—0,8
Тирозин	0,4—0,7
Метионин	0,4—0,6
Изолейцин	0,4—0,6
Фенилаланин	0,2—0,6
Триптофан	0,5—0,6
Серин	0,4—0,6
Треонин	0,3—0,6
Гистидин	0,2—0,3
Цистин	0,2—0,3
Сумма аминокислот	До 43,5
Азотистые вещества	
Общий азот	5,2—7,9
Протеин (N×6,25)	37,5—49,4
Белковый азот	1,9—3,6
α-Аминный азот	0,9—2,0
Аммиачный азот	0,3—1,4
Азот бетаина	0,82—1,66
Витамины, мкг/г	
Тиамин (витамин B_1)	1,7—9,7
Рибофлавин (витамин B_2)	84,2—160,0
Пантотеновая кислота (витамин B_3)	30—60
Фолиевая кислота (витамин B_4)	10—20
Пиридоксин (витамин B_6)	200—340
Никотиновая кислота (витамин PP)	8,0—10,0
Различные органические вещества	
Бетаин	6,0—13,0
Редуцирующие вещества	4,6—12,7
Жиры	1,3
Клетчатка	0,3
Минеральные вещества	
Зола (на СВ)	19,0—28,0
Кальций (на золу)	5,2—12,5
Калий	28,6—33,6
Натрий	0,8
Магний	1,1—1,5
Железо	0,1—0,25
Фосфор	2,2—4,4
Кремний	10,9—11,5

Микроэлементы	Содержание, мг %
Цинк	1821,0
Кобальт	67,8
Кадмий	476,7
Молибден	545,9
Марганец	3071,0
Медь	280,0

На основе готовой культуральной жидкости можно получать *кристаллические* препараты лизина. Первым этапом в этой технологии является освобождение от твердой взвеси центрифугированием и получение фильтрата культуральной жидкости. Лизин извлекают из фильтрата культуральной жидкости с помощью ионообменной смолы КБ-4П-2 или КУ-2. Сорбция лизина осуществляется на катионит в аммонийной форме:

$$\text{Лизин}^{+2} + 2\left(NH_4^+\right)\cdot\text{катионит} \rightarrow \left(2NH_4^+\right) + \left(\text{Лизин}^{+2}\right)\cdot\text{катионит}.$$

Затем колонки тщательно промывают до бесцветной промывной воды и осуществляют элюцию. Элюция лизина с катионита производится 0,5—5,0%-ным раствором аммиака до отсутствия следов лизина в последних порциях стекающего элюата. В элюат переходит 80—90% сорбированного лизина, получают 1—2%-ный раствор лизина. Десорбция лизина протекает по следующей схеме:

$$\left(\text{Лизин}^{+2}\right)\cdot\text{катионит} + \left(2NH_4^+\right) \rightarrow \text{Лизин}^{+2} + \left(NH_4^+\right)\cdot\text{катионит}.$$

Элюат помимо лизина содержит значительное количество аммиака, который удаляется при нагревании, а освобожденный от аммиака элюат подкисляется соляной кислотой до pH 4,9—5,0 и упаривается в вакуум-выпарном аппарате при температуре 60° С до концентрации лизина 30—50%. При взаимодействии лизина с соляной кислотой образуется монохлоргидрат лизина, который выпадает при охлаждении до температуры 10—12° С из концентрата в виде желтоватых кристаллов. Эти кристаллы отделяют от маточного раствора и, если предполагается использовать такой лизин для кормовых целей в животноводстве, кристаллы лизина высушивают и фасуют, маточный же раствор отправляют на повторное концентрирование для утилизации оставшегося там лизина. Если же предполагается получение высокоочищенных препаратов лизина, то кристаллы первой ступени выделения

подвергают многостадийной очистке от красящих веществ и других примесей. Перекристаллизация лизина проводится из этилового спирта.

Очищенный лизин используется для пищевых, медицинских и других целей. Он состоит из 95—97% монохлоргидрата лизина и 2—4% золы. Потери лизина в процессе выделения кристаллического препарата составляют около 30%.

Завершается процесс производства лизина любой степени чистоты фасовкой, упаковкой и складированием готового продукта. Фасуют препараты в полиэтиленовые мешки, которые герметизируют и дополнительно упаковывают в крафт-мешки или в случае кристаллического препарата — в картонные коробки.

§ 4. АППАРАТУРНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ЛИЗИНА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ОЧИСТКИ

Принципиальная технологическая схема получения лизина представлена на рис. 117.

Приготовление питательной среды для культивирования продуцентов лизина осуществляется в две стадии. Свекловичная меласса приготовляется отдельно от других компонентов среды. Ее разогревают и транспортируют в смеситель *1*, где при перемешивании и разогреве она растворяется в горячей воде. Питательные соли и все другие компоненты среды растворяются в смесителе *2*, но с таким расчетом, чтобы при последующем совмещении этих растворов получились требуемые регламентом концентрации компонентов в среде. Затем приготовленные смеси поступают в нагревательную колонку *3*, в выдерживатель *4* и на охлаждение в теплообменник *5*. Режимы стерилизации для первой порции и второй различны, о чем говорилось в предыдущем разделе. Стерильная охлажденная питательная среда далее поступает в ферментатор *6*, заполняя его на 70—75%. Для начала ферментации необходимо ввести в среду посевной материал. Исходная культура подготавливается в микробиологической лаборатории завода. И если приготовление посевного материала идет периодически, то после выращивания в качалочных колбах культура передается на первую *8* и затем на вторую *9* ступени инокулято-

ров, где получают необходимые объемы посевной культуры. Стерилизация питательной среды осуществляется в самих посевных аппаратах, предварительная же гомогенизация среды осуществляется в специальном посевном смесителе *7*, так как в инокуляторах первой ступени, а часто и во второй нет перемешивающих устройств.

Для осуществления культивирования продуцента в посевных аппаратах *8* и *9* и в ферментаторе *6* необходим стерильный воздух. Для этого используется целая систе-

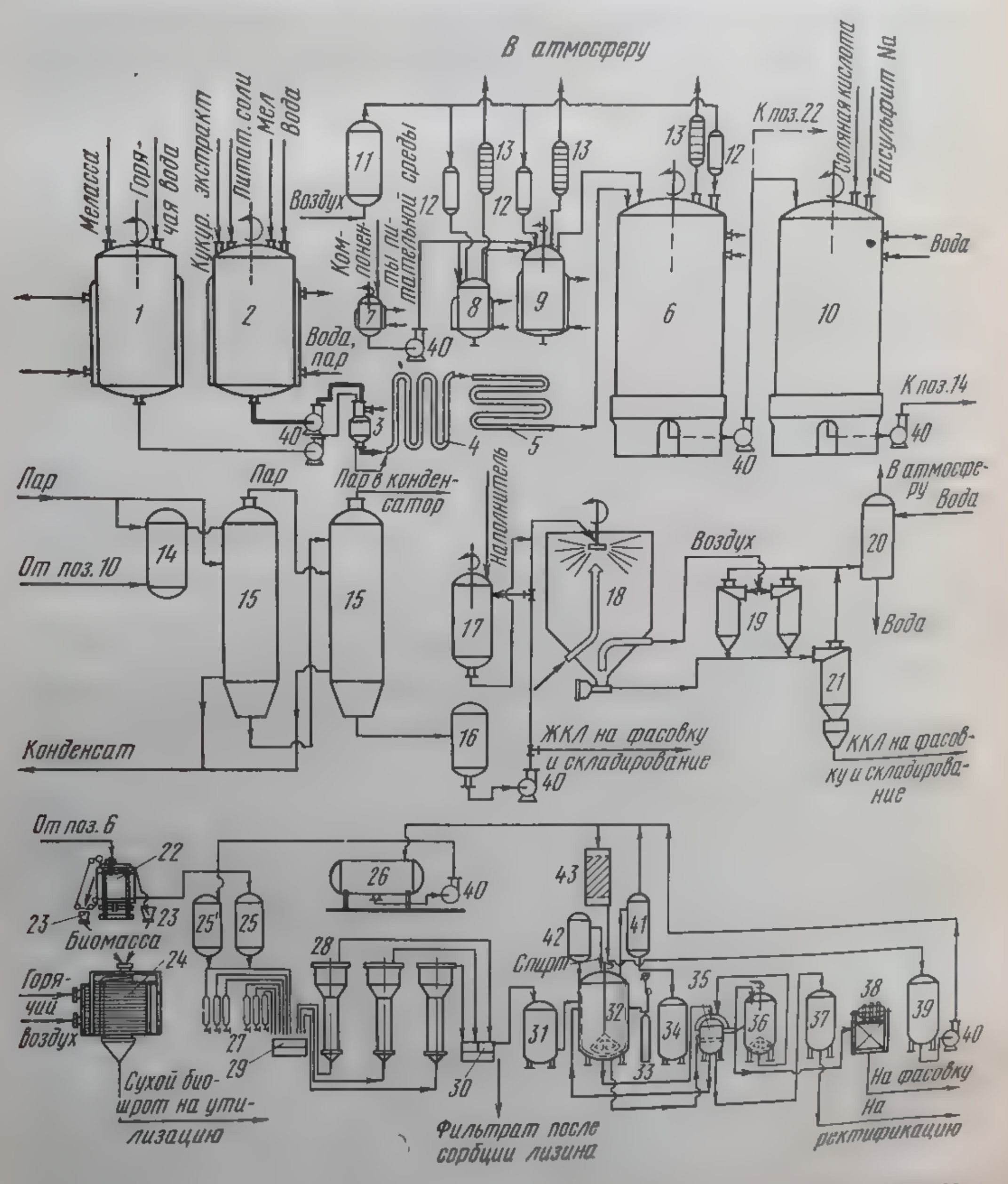


Рис. 117. Аппаратурно-технологическая схема производства лизина.

ма фильтров и кондиционеров. Воздух забирается из атмосферы, очищается от грубой взвеси в висциновом фильтре и поступает в турбокомпрессор, где происходит его сжатие, температура воздуха поднимается до 150—160° С; затем воздух охлаждается, отделяется конденсат и далее воздух подается в ресивер, обеспечивающий равномерность подачи воздуха в ферментатор. Подготовленный таким образом воздух поступает в заполненный активированным углем и стекловатой головной фильтр *11* и затем — на систему индивидуальных фильтров, заполненных специальными обеспложивающими материалами и установленных на каждом ферментаторе и инокуляторе. Отходящий из ферментатора воздух перед выбросом в атмосферу вновь очищается от клеток самого продуцента на воздушных фильтрах *13* с тем, чтобы не загрязнять окружающей среды. В процессе культивирования для пеногашения используют стерильные пеногасители. Подача их в ферментаторы осуществляется автоматически в зависимости от высоты образовавшейся пены из аппарата *12*. В процессе культивирования идет накопление лизина.

Обобщение производственных данных по биосинтезу лизина Brevibacterium sp. 22 позволило составить приближенное суммарное уравнение процесса, которое в общем виде можно записать следующим образом:

$$100\,C_6H_{12}O_6 + 219\,O_2 + 86\,NH_3 \rightarrow 35C_6H_{14}O_2N_2 + 16C_8H_{13}O_4N + 262\,CO_2 + 380\,H_2O.$$

Из этого выражения следует, что из каждого моля глюкозы можно получить 0,35 моля лизина, т. е. 28% от потребленной в процессе биосинтеза глюкозы. Практически с учетом того, что получают не чистый лизин, а монохлоргидрат лизина, выход продукта составляет около 35%.

Длительность культивирования зависит от продуцента и условий введения в процесс питательных веществ. Если процесс периодический, то длительность не превышает 70—72 ч.

Готовая культуральная жидкость, содержащая биомассу продуцента, твердую взвесь среды и всю сумму веществ, может быть использована для получения трех продуктов: жидкого концентрата лизина (ЖКЛ), сухого концентрата кормового лизина (ККЛ) и кристалличе-

ского лизина. При получении препаратов ЖКЛ и ККЛ биомасса и твердая взвесь из культуральной жидкости не удаляются.

При непосредственном высушивании или концентрировании культуральной жидкости наблюдаются значительные потери лизина. Поэтому культуральная жидкость подвергается стабилизации. Этот процесс осуществляют в специальной емкости *10*, куда при перемешивании подается сначала 25%-ный раствор бисульфита натрия в количестве 0,4% к объему культуральной жидкости, а затем соляная кислота до pH 4,5—5,0. В результате образуется монохлоргидрат лизина, более устойчивый к термическому воздействию.

Перед выпариванием культуральная жидкость подогревается в теплообменнике *14* до температуры 95—100° С и далее поступает в двухкорпусную выпарную установку *15*. Упаренная культуральная жидкость с содержанием сухих веществ около 40% поступает в сборник *16* — это и есть ЖКЛ. Жидкий концентрат лизина далее насосом *40* перекачивается в специальные складские емкости, а лучше сразу в авто- и железнодорожные цистерны и поставляется в животноводческие комплексы или на комбикормовые заводы для обогащения кормов.

Концентрат культуральной жидкости может быть высушен непосредственно в распылительной сушилке *18*, тогда получают препарат ККЛ без наполнителя. Культуральная жидкость попадает на распылительный диск сушильной башни и распыливается, мельчайшие капельки встречаются с горячим воздухом, влага мгновенно испаряется, а порошок с влажностью 4—8% поступает в циклон-разгрузитель *21*. С теплоносителем из сушильной башни выносится часть препарата, поэтому воздух проходит через циклоны *19*, где отделяется основная масса препарата, который также поступает в циклон-разгрузитель *21*. Воздух для дополнительной очистки проходит еще через скруббер *20* и только после этого выбрасывается в атмосферу. Если воды, омывающие насадку скруббера, содержат заметные количества лизина, их можно присоединить к культуральной жидкости перед аппаратом *14*.

Чтобы уменьшить потери при сушке распылением, а также для снижения гигроскопичности препарата ККЛ

в концентрат можно внести наполнитель. Это осуществляется в смесителе *17*, а затем полученная масса подается на распыление, так же как и в первом случае, или же в сушилку любой другой конструкции. В качестве сушильного агента используется нагретый до 250° С воздух. Полученный сухой кормовой концентрат лизина фасуется в мешок из двойной крафт-бумаги с полиэтиленовой прокладкой, герметизируется, этикетируется и отправляется на склад готовой продукции.

Кристаллический препарат лизина получают непосредственно из фильтрата культуральной жидкости без ее стабилизации. Культуральная жидкость из ферментатора *6* поступает на фильтрационную установку *22*, где отделяются биомасса продуцента и находящиеся в среде твердые частицы (мел), которые поступают в сборники влажного осадка *23* и затем высушиваются в сушилке *24*. Сухой биошрот может быть использован как обогатительная добавка в корма сельскохозяйственных животных. Тщательно очищенный фильтрат, имеющий pH около 7, перекачивается в напорный сборник *25*, а оттуда через ротаметры *27*, регистрирующие скорость поступления всех растворов, — в ионообменные колонны *28*, заполненные катионитом КБ-4П-2 в аммонийной форме. Лизин сорбируется на ионитах. Соотношение высоты слоя ионита к диаметру колонки колеблется от 8 : 1 до 10 : 1, каждые 100 г ионита сорбируют до 6—8 г лизина. Для сорбции устанавливается несколько ионообменных колонн. В основании колонн располагается специальная решетка с щелевыми колпачками, предназначенная для распределения жидкости и предупреждения уноса смолы. На решетку насыпается слой измельченного инертного материала, например стекла высотой около 0,15—0,20 м, а уж выше этого слоя располагается смола. Подача фильтрата культуральной жидкости осуществляется с низу колонны. Все входы и выходы в систему ионообменных колонн сблокированы в виде коммутаторов *29* и *30*, что позволяет рационально вести управление процессом сорбции. Через колонны пропускают фильтрат культуральной жидкости до тех пор, пока не появятся следы лизина, тогда прекращают подачу фильтрата и промывают колонну деионизированной водой по принципу «кипящего слоя». Эта вода частично в зависимости от содержания в ней лизина возвращается в процесс для

извлечения из нее лизина. Фильтрат культуральной жидкости после сорбции лизина удаляется. Элюция лизина с ионообменной смолы производится раствором аммиака, который насосом *40* из цистерны *26* подается в напорную емкость *25'*. Из этого сборника раствор аммиака поступает в ионообменные колонки с лизином и десорбирует его. Первые порции элюата, содержащие следы лизина, отбрасываются, основное же количество элюата поступает в сборник *31*. Элюция продолжается до тех пор, пока содержание лизина не упадет до следовых количеств. В процессе элюции происходит перезарядка ионообменной смолы в аммонийную форму, что позволяет вновь использовать ее для сорбции лизина. Взрыхляют смолу перед новым циклом сорбции промывкой ее деионизированной водой. Элюат из сборника *31* поступает в выпарной аппарат *32*, где первоначально освобождается от аммиака. Выпаривание аммиака ведется при температуре до 80° С. Пары аммиака поступают в холодильник *41*, поглотительную колонну *43* и сборник *39*. В выпарной аппарат к водному раствору лизина добавляют из мерника *42* 2н. раствор соляной кислоты при постоянном помешивании до pH 4,9. Подкисленный элюат выпаривают в том же аппарате под вакуумом, пары конденсируют в холодильнике *41* и конденсат собирают в сборнике *34*. Затем концентрат в вакуум-выпарном аппарате охлаждают, в результате чего выпадают кристаллы монохлоргидрата лизина. Кашеобразная масса кристаллов под давлением сжатого азота, поступающего из баллона *33*, передавливается на нутч-фильтр *35*. Отделяемый на фильтре фильтрат содержит большое количество лизина и потому поступает вновь в аппарат *32*, где смешивается с новой порцией элюата. Если лизин предназначен для кормовых целей, то он сразу же с нутч-фильтра *35* поступает на циркуляционную или любую другую сушильную установку *38* и далее идет на фасовку и упаковку. Если же получают кристаллический препарат лизина для использования в пищевой промышленности, то кристаллы лизина с нутч-фильтра подают в кристаллизатор *36*, где их растворяют в 3—4 объемах деионизированной воды при температуре около 70° С. Для снятия пигментов раствор лизина в этом же аппарате обрабатывается активированным углем и вновь передается на нутч-фильтр *35*. Фильтрат, освобожденный от пигмента,

возвращается в выпарной аппарат и упаривается под вакуумом. К очищенному концентрату лизина добавляется 3—4-кратное количество этилового спирта, выпадают кристаллы лизина, которые в виде кашеобразной массы передаются сжатым азотом на нутч-фильтр, где освобождаются от спирта, который поступает в сборник *37*, а кристаллы лизина — на сушильную установку *38*. Высокоочищенный кристаллический лизин фасуется в полиэтиленовые пакеты, упаковывается в картонные коробки и хранится в сухом помещении.

Для продуцента Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика предлагает более простой способ получения кристаллического лизина. Этот способ не предусматривает отделения из культуральной жидкости биомассы, но ставит обязательным условием работу на светлых средах. Культуральная жидкость подкисляется серной кислотой, затем производится сорбция лизина на сульфокатионите КУ-2-8, сорбат промывают водой и лизин элюируют аммиаком, аммиак отделяют выпариванием, концентрат нейтрализуют соляной кислотой. После этого нейтрализат доупаривают и проводят кристаллизацию лизина в виде монохлоргидрата, который высушивается и расфасовывается. Межкристальная жидкость, содержащая некоторое количество лизина, возвращается на стадию подкисления культуральной жидкости серной кислотой.

Безусловно, этот способ проще и экономически более выгоден, чем первый.

Глава 4. ПРОИЗВОДСТВО ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ТРИПТОФАНА

Микробиологическая промышленность СССР в недалеком будущем предполагает выпускать с использованием микроорганизмов глутаминовую кислоту, триптофан и некоторые другие аминокислоты.

Принципиальная технологическая схема получения многих аминокислот имеет очень много общего со схемой производства лизина, которая была подробно рассмотрена в предыдущем разделе.

Основные отличия заключаются в свойствах продуцентов, условиях культивирования их, составе среды и некоторых этапах очистки. Последовательность же операций и требования к технологическому процессу в целом очень близки для различных аминокислот.

§ 1. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Глутаминовая кислота относится к заменимым аминокислотам, она обладает очень приятными органолептическими свойствами и потому имеет широкое применение в различных областях, о чем говорилось раньше.

Существует несколько способов промышленного получения глутаминовой кислоты. Наиболее широко в мире используются способы микробного синтеза глутаминовой кислоты и непосредственного выделения этой кислоты из свекловичной мелассы. Продуцентами глутаминовой кислоты являются штаммы бактериальных культур Corynebacterium glutamicum и Brevibacterium flavum.

Глутаминовая кислота микроорганизмами может образовываться двумя путями:

при восстановительном аминировании α-кетоглутаровой кислоты с образованием глутаминовой кислоты — α-кетоглутаровая кислота $+ NH_4^+ +$ НАДФ$\cdot H_2$ (или НАД$\cdot H_2$) $\xrightleftharpoons{\text{глутаматдегидрогеназа}}$ α-глутаминовая кислота $+ H_2O +$ НАДФ (или НАД);

при реакции переаминирования α-кетоглутаровой кислоты с аминокислотами пула свободных аминокислот микробной клетки: α-кетоглутаровая кислота + аминокислота $\xrightleftharpoons{\text{трансаминаза}}$ α-глутаминовая кислота + α-кетокислота.

В том и другом случае предшественником глутаминовой кислоты является α-кетоглутаровая кислота, содержание которой пополняется за счет реакций, протекающих в цикле трикарбоновых кислот.

Но для того чтобы процесс шел, необходимо получить мутант с нарушенной ферментативной системой превращения α-кетоглутаровой кислоты в янтарную кислоту.

В нашей стране для биосинтеза глутаминовой кислоты используют ряд подобного рода культуры, например Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490, Corynebacterium glutamicum 541P, Brevibacterium sp. 22 и некоторые другие.

У продуцента глутаминовой кислоты помимо нарушенного образования α-кетоглутаратдегидрогеназы желательно иметь недостаточность по биосинтезу аланинде-

гидрогеназы и лактатдегидрогеназы с тем, чтобы избежать непродуктивного расхода углеводов среды на образование из пировиноградной кислоты аланина и молочной кислоты, это особенно сильно сказывается на выходе глутаминовой кислоты при недостаточной аэрации и при избытке в среде биотина, но таких мутантов пока нет.

Состав питательной среды для главной ферментации и для получения посевного материала в значительной степени зависит от используемого продуцента, от его физиологических особенностей. Основным источником углерода в среде чаще всего используются глюкоза, сахароза, гидролизаты крахмала, свекловичная меласса, гидрол. Количество усваиваемого сахара в пересчете на

сахарозу должно быть в пределах от 8,5 до 25%. Но следует помнить, что пределы использования мелассы определяются уровнем в ней биотина. Концентрация биотина, по данным большинства исследователей, не должна превышать 2—5 мкг на 1 л питательной среды, иначе вместо глутаминовой кислоты будут интенсивно накапливаться аланин, молочная, янтарная, аспарагиновая кислоты, и резко возрастет прирост биомассы продуцента. Иными

Таблица 53

Концентрация биотина, мкг/л	Биомасса, г/л	Глутаминовая кислота	
		г/л	% от ассимилированного сахара
Меласса			
2,50	4,0	27,5	41,5
3,40	7,6	35,0	35,0
4,25	9,5	25,0	25,0
Кукурузный экстракт (50% СВ)			
2,40	4,2	24,0	37,5
3,20	6,4	37,5	46,9
4,00	12,0	22,0	22,0

словами, максимум биосинтеза глутаминовой кислоты не совпадает с максимумом образования биомассы, так как потребность в биотине для этих двух процессов различна. Помимо мелассы биотин в среду может быть внесен и с кукурузным экстрактом. Влияние биотина на способность *Corynebacterium glutamicum* 541Р образовывать α-глутаминовую кислоту представлено в табл. 53.

На биосинтез глутаминовой кислоты оказывают стимулирующее влияние некоторые насыщенные жирные кислоты, ПАВ и антибиотики. Вероятно, это влияние связано с изменением липидного состава клеточных мембран, что способствует увеличению проницаемости клеточных мембран для глутаминовой кислоты. Присутствие такого рода стимуляторов позволяет вести ферментацию с большим выходом глутаминовой кислоты при повышенных концентрациях биотина. Так, например, внесение в среду твина-60 (0,15%) или дилудина (0,01%), или ка-

лиевой соли бензилпенициллина (5 ед./мл) способствует повышению биосинтетической деятельности продуцента на 15—45%, и выход глутаминовой кислоты достигает 53—60 г/л. Такая возможность особенно реальна в случае использования антибиотика, так как известно, что пенициллин ингибирует синтез липоглюкопротеидного комплекса клеточной оболочки, сохраняя способность клеток к синтезу аминокислот.

В качестве источника азота в питательных средах чаще всего используют мочевину в количестве до 1,5—2,0% в зависимости от особенностей используемого штамма, но вводится она дробно, по мере потребления ее из среды, и так, чтобы содержание ее в культуральной жидкости не превышало 0,8% и pH среды было в пределах от 6,8 до 7,8. Реже используется как дополнительный к мочевине источник азота $(NH_4)_2SO_4$ и NH_4Cl в количестве до 0,5% каждого или водный раствор аммиака.

Недостаток азота в среде приводит к снижению синтеза глутаминовой кислоты и к накоплению в среде повышенных количеств α-кетоглутаровой кислоты.

Для нормального роста культуры и образования ею глутаминовой кислоты необходимо вводить в среду соли калия в виде KH_2PO_4 до 0,1—0,2%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — до 0,03—0,3%; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ — до 0,001%, а также мел для поддержания pH среды на оптимальном уровне — около 7—7,2. Длительность культивирования зависит от содержания сухих веществ в среде, способа введения компонентов среды (единовременно или дробно), степени аэрации среды и, конечно, от физиологических особенностей продуцента.

При периодическом способе культивирования посевной материал выращивают, начиная от пробирки до большого инокулятора, на каждой стадии по 24 ч. В ферментатор вносится посевной материал из расчета 5—6% к рабочему объему ферментатора. В аппарате длительность культивирования от 2 до 3 сут. Большое влияние на длительность процесса оказывает аэрация питательной среды. Наименьшая длительность процесса выращивания (48 ч) и наибольшая способность к образованию глутаминовой кислоты наблюдаются для штамма Corynebacterium glutamicum 541P при аэрации 40—45 мг O_2 на 1 л в минуту, а для Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490 — при 80—85 мг O_2 на 1 л в минуту.

При этих условиях культивирования достигается накопление глутаминовой кислоты до 40—50 г/л (табл. 54).

Таблица 54

Показатели	Посевной материал		Главная ферментация	
	Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490	Corynebacterium glutamicum 541Р	Corynebacterium ВНИИгенетика-490	Corynebacterium glutamicum 541Р
Меласса, %	8,0	1,5	20,0	1,2
Сахароза, %	—	5,0	—	8,5—10
Кукурузный экстракт, %	0,3	—	—	—
NH_4Cl, %	0,5	—		—
K_2HPO_4, %	0,05	0,1	0,05	0,1
KH_2PO_4, %	—	0,1	—	0,1
$ZnSO_4$, %	—	—	—	0,1
$MgSO_4$, %	0,03	0,1	0,03	0,1
Мочевина, %	—	1,0	2,0	0,5
Мел, %	—	—	1,0	—
Длительность, ч	24	24	48	48
Аэрация, мг O_2/(л·мин)	—	—	80—85	40—45
Титр, кл/мл	От $46 \cdot 10^9$ до $50 \cdot 10^9$		—	
Глутаминовая кислота, г/л	Следы		40—50	До 50

Принципиальная технологическая схема получения глутаминовой кислоты или глутамата натрия складывается из следующих стадий: получение посевного материала; приготовление питательной среды, ее стерилизация, охлаждение и засев готовым посевным материалом; выращивание продуцента в ферментаторе до накопления максимального количества глутаминовой кислоты; выделение глутаминовой кислоты в кристаллическом виде или в виде кристаллов глутамата натрия, сушка кристаллов, фасовка и упаковка.

Сравнение этой схемы со схемой получения *L*-лизина говорит о их почти полной идентичности. Наиболее существенные различия имеют место только на стадии выделения продукта из фильтрата культуральной жидкости.

Готовый препарат глутаминовой кислоты имеет чистоту 98—99%, многократная перекристаллизация с целью дальнейшей очистки приводит к большим поте-

Схема 7. Основные стадии получения глутаминовой кислоты по двум схемам.

Corynebacterium glutamicum 541 P (по Бекеру М. Е.) — Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490

ГОТОВАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ

Corynebacterium glutamicum 541 P (по Бекеру М. Е.):

↓ Отделение биомассы центрифугированием

↓ Осветление фильтрата активным углем и отделение осадка

↓ Концентрирование фильтрата вакуум-выпариванием до содержания сухих веществ 40—50%

Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490:

↓ Обработка культуральной жидкости CaO и отделение биомассы центрифугированием

↓ Осаждение избытка кальция фосфорной кислотой и повторное отделение осадка

↓ Освобождение от пигмента с помощью ионообменной смолы ИА-1 и вакуум-упаривание элюата в 2—3 раза

Общая стадия:

↓ **Подкисление соляной кислотой концентрата до pH 3,2** (изоэлектрическая точка глутаминовой кислоты), охлаждение до 15° С и выпадение кристаллов со степенью чистоты по глутаминовой кислоте

Corynebacterium glutamicum 541 P:

~80% ↓ Растворение кристаллов в горячей воде в соотношении 1 : 5, обработка активным углем, фильтрация

↓ Повторная кристаллизация, кристаллы имеют чистоту 99% по глутаминовой кислоте

↓ Сушка кристаллов

↓ Готовый препарат глутаминовой кислоты

Corynebacterium glutamicum ВНИИгенетика-490:

~98% ↓ Сушка кристаллов

↓ Готовый препарат глутаминовой кислоты

рям. Но в зависимости от используемого продуцента схема выделения может иметь существенные различия (схема 7).

Для получения глутамата натрия влажные кристаллы с содержанием 98—99% глутаминовой кислоты по сухой массе растворяют и нейтрализуют 45—50%-ным раствором NaOH до pH 6,8. Этот раствор концентрируют, и при охлаждении выпадают кристаллы глутамата натрия, которые высушивают. Готовый препарат состоит на 98% из глутамата натрия. Выход готового продукта по глутаминовой кислоте по отношению к ее содержанию в исходной культуральной жидкости составляет 75—80%, максимально достигнутый выход не превышает 90%.

§ 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ *L*-ТРИПТОФАНА

Триптофан является незаменимой аминокислотой, содержание ее, особенно в растительных белках, невелико. Но потребность в триптофане значительно меньше, чем в лизине и глутаминовой кислоте. Триптофан в небольших количествах используется в животноводстве, медицине и при различных биохимических исследованиях. Вместе с тем это очень важная аминокислота, она входит в белки и участвует в многочисленных превращениях соединений, имеющих циклическую структуру. Отсутствие этой аминокислоты или нарушение процессов синтеза ее ведет к тяжелым заболеваниям организма.

Путем микробного синтеза *L*-триптофан можно получить двумя способами: трансформацией предшественников *L*-триптофана с помощью ферментных систем микроорганизмов до *L*-триптофана; получением с помощью мутанта, недостаточного по тирозину и фенилаланину, прямым синтезом *L*-триптофана без предшественника.

В первом варианте используются в качестве предшественника антраниловая кислота и особые штаммы дрожжей Candida utilis, превращающие ее сначала в индол, а затем с участием серина в присутствии пиридоксальфосфата под действием триптофансинтазы образуется триптофан.

Последний этап превращения антраниловой кислоты в *L*-триптофан связан с ферментом триптофансинтазой. Реакция протекает в две стадии. При этом важно отме-

Антраниловая кислота $\xrightarrow{+\text{Фосфорибозил-пирофосфат}}$ N-(5'-фосфорибозил)-антраниловая кислота →

→ $C_6H_4(COOH)$–NH–CH=C(OH)–CH(OH)–CH(OH)–$CH_2OPO_3H_2$ $\xrightarrow{-CO_2}$

→ Индол-3-глицерофосфат (индол–CH(OH)–CH(OH)–$CH_2OPO_3H_2$) →

$\xrightarrow{\text{Триптофансинтаза}}$ Триптофан (индол–CH_2–CH(NH_2)–COOH)

Серин ($HOCH_2CH(NH_2)COOH$) → Глицеральдегид-3-фосфат

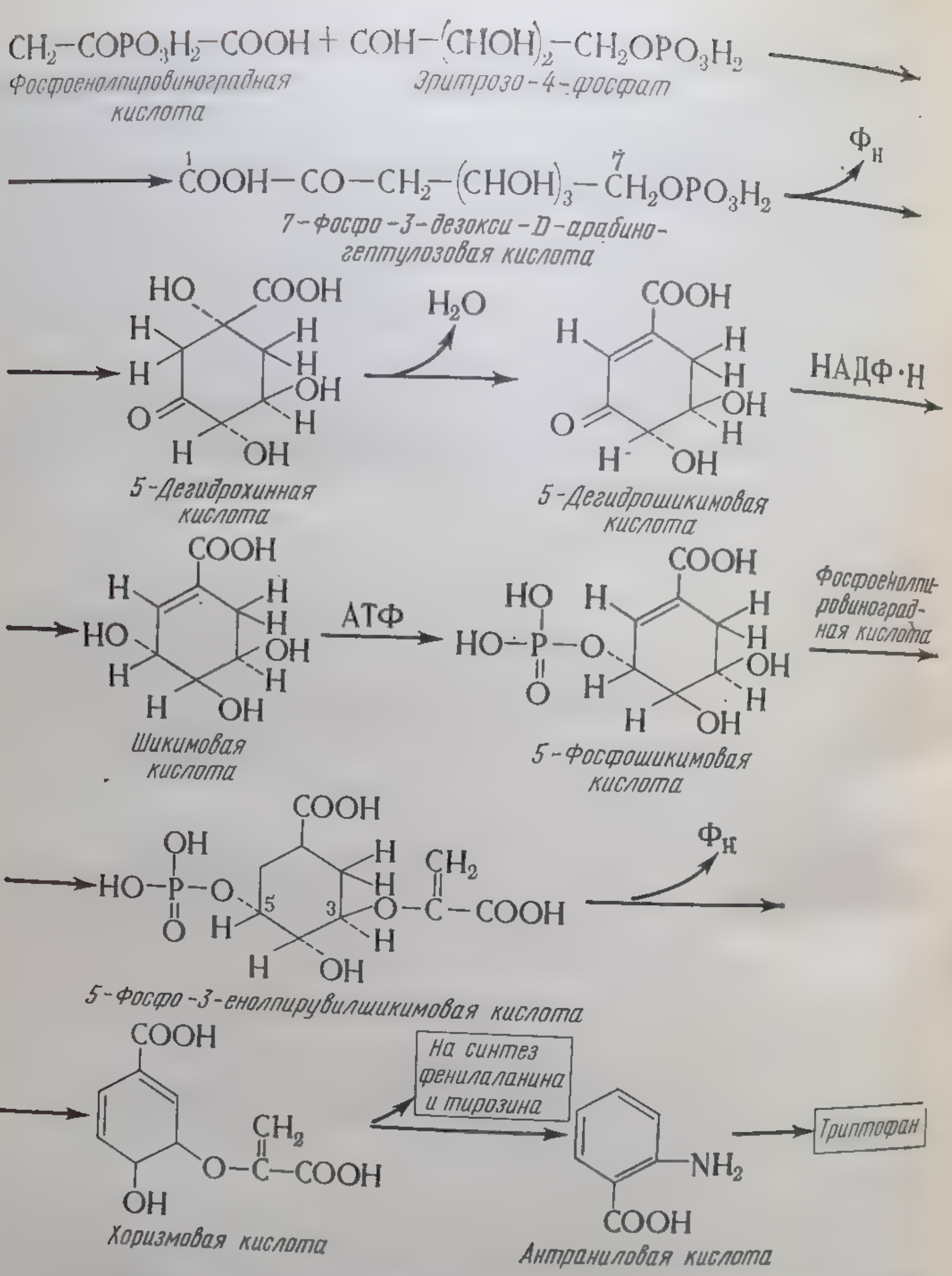
тить, что образовавшийся на первой стадии индол остается связанным с активным центром триптофансинтазы:

I. Индол-3-глицерофосфат — [индол] + Глицеральдегид-3-фосфат;

II. [Индол] + Серин → Триптофан + H_2O.

Во втором варианте используются мутанты, способные продуцировать L-триптофан и имеющие нарушения в цепи синтеза фенилаланина и тирозина. Для прямого синтеза используются различные бактериальные штаммы, относящиеся к виду Bacillus subtilis.

Путь синтеза триптофана, а также фенилаланина и тирозина был изучен на мутантных штаммах E. coli. В общем виде последовательность превращений в этой цепи биосинтеза следующая:



Особый интерес в этом биосинтезе представляет образование из алифатических предшественников циклических соединений, особенно шикимовой кислоты, которая имеет большое значение в общем обмене веществ организма. Из шикимовой кислоты через ее фосфорсодержащее производное (5-фосфо-3-енолпирувилшикимовая кислота) образуется хоризмовая кислота, являющаяся ключевым метаболитом на пути синтеза фенилаланина, тирозина и триптофана.

В случае блокирования фермента, превращающего хоризмовую кислоту в префеновую кислоту (предшественник фенилаланина и тирозина), биосинтез может идти более полно по пути накопления антраниловой кислоты и *L*-триптофана.

Технология *L*-триптофана из антраниловой кислоты разработана в нашей стране совместными усилиями Институтов микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР и АН СССР. Трансформация антраниловой кислоты по этой технологии осуществляется с помощью ферментных систем дрожжей Candida utilis 295-*t*.

Технологический процесс разделяется на два этапа: получение биомассы дрожжей и трансформация предшественника с помощью накопленной биомассы дрожжей.

Первая стадия процесса мало чем отличается от обычного выращивания микроорганизмов. Она складывается из получения посевного материала и из культивирования дрожжей в ферментаторе с целью максимального накопления биомассы микроорганизма.

Посевной материал можно получать периодически (исходный штамм в пробирке → выращивание в колбе на качалке → выращивание в лабораторном ферментаторе, а затем в инокуляторе) или непрерывно, так же как это было изложено в технологии лизина. В зависимости от способа получения посевного материала содержание биомассы продуцента в посевной культуральной жидкости может быть различным — от 3—5 г/л при периодическом способе выращивания до 15 г/л при непрерывном. Установлено, что чем больше вводится посевного материала, тем выше степень трансформации антраниловой кислоты. Выращивают культуру при температуре 30° С в течение 24 ч в каждом пассаже.

Источником углерода обычно служит либо сахароза, либо меласса, задаваемая в среду в количестве от 6,3 до 20%, в качестве источника азота применяют мочевину, которую вносят в количестве от 0,5 до 1,0%, в среду добавляют соли (в %): K_2HPO_4—0,01; $MgSO_4$—0,005; $CaCl_2$—0,01; pH среды 7,5—8,0.

В ферментатор после 24-часового роста культуры начинают вводить спиртовой 5%-ный раствор антраниловой кислоты (рис. 118) и 50%-ный раствор мочевины каждые 6 ч. Кроме того, после внесения первой порции

27—212

антраниловой кислоты через 3—4 ч с периодичностью в 12 ч вносится дополнительно меласса в виде 25%-ного раствора.

Момент внесения первой порции антраниловой кислоты считается началом второго этапа в технологии триптофана. Общая длительность второго этапа около 120 ч.

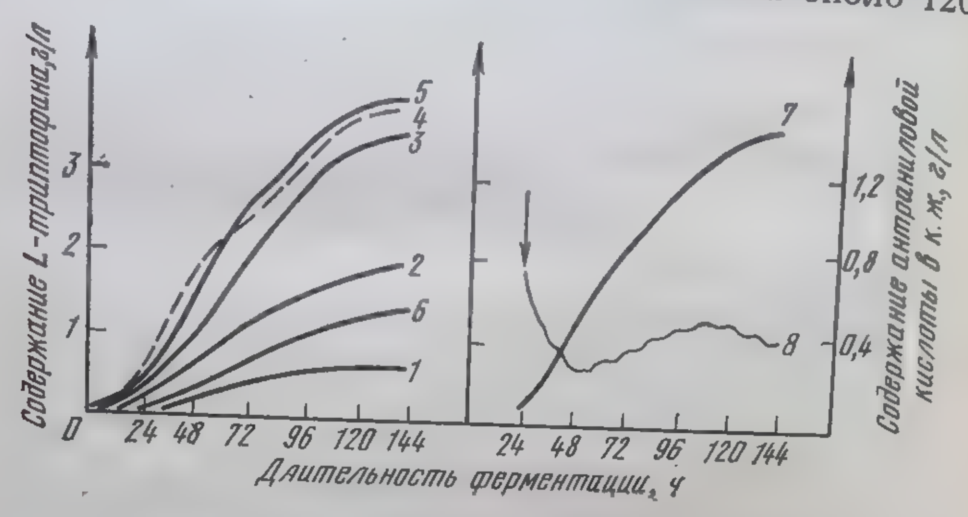


Рис. 118. Зависимость накопления триптофана от pH среды (*1*—5,5; *2* — 6,0; *3* — 7,0; *4* — 7,5; *5* — 8,2; *6* — 9) и характер изменения содержания триптофана (*7*) и антраниловой кислоты (*8*) в течение второй стадии процесса.

Дробное внесение антраниловой кислоты связано с тем, что она ядовита и только после исчерпания ее до определенного значения можно вновь вводить ее в культуральную жидкость. Можно использовать в качестве предшественника и другие соединения, но все же самые лучшие результаты получаются с антраниловой кислотой:

Предшественник триптофана	Выход триптофана, %
Антраниловая кислота	98,8
Индол	87,2
Индол+серин (1:2)	92,5
Индол+цистеин (1:2)	89,5
Индол+аланин (1:4)	87,0
Индолил-3-пировиноградная кислота	39,9
DL-Индолил-3-молочная кислота	23,8

Существенное влияние на трансформацию антраниловой кислоты культурой Candida utilis 295-t оказывает pH среды около 8,0. Степень аэрации имеет также большое значение. В период роста культуры аэрация должна

быть высокой, не менее 7 г O_2/(л·ч), в период же трансформации предшественника она снижается в два раза [3—4 г O_2/(л·ч)]. Готовая культуральная жидкость в конце ферментации содержит от 7,8 до 12,5% сухих веществ, из них 0,3—0,5% триптофана. Триптофан на 85—88% находится в жидкой фазе культуральной жидкости. Поэтому для получения очищенного препарата триптофана используют фильтрат культуральной жидкости, а для кормовых целей получают кормовой концентрат, в который входит и биомасса продуцента.

Таким образом, из готовой культуральной жидкости можно получить два препарата: кормовой концентрат триптофана (ККТ) и очищенный препарат *L*-триптофана.

Кормовой концентрат триптофана получают путем упаривания всей культуральной жидкости до 1/3 от общего объема с последующим высушиванием на распылительной сушилке при температуре входящего теплоносителя 110—120° С. Получается светло-коричневый порошок, который и представляет собой готовый препарат ККТ. Состав такого препарата следующий: сухие вещества — 90%; белковые вещества — 48—54%; общий триптофан 1—3%; витамины (в мг/кг): B_1 — от 15 до 18,5; B_2—от 24,5 до 32,6; PP — от 620 до 680; аминокислоты — 6%, в числе которых (в % от их суммы): лизин — 3,22; гистидин — 1,21; аргинин — 0,85; аспарагиновая кислота — 5,21; треонин — 2,27: серин — 2,47; глутаминовая кислота — 7,58; пролин — 2,06; глицин — 2,19; аланин — 3,0; цистин — 0,37; валин — 1,57; метионин — 0,5; изолейцин — 2,94; лейцин — 2,54; тирозин — 1,42; фенилаланин — 1,21.

Очищенный препарат *L*-триптофана получают из фильтрата культуральной жидкости. Последовательность операции при получении очищенного *L*-триптофана следующая:

1) отделение биомассы продуцента центрифугированием;

2) подкисление соляной кислотой фильтрата культуральной жидкости до pH 1,0 и отделение выпавшего осадка повторным центрифугированием;

3) сорбция триптофана на катионообменной смоле КУ-2 в H-форме в динамических условиях при скорости 1—3 мл/(см²·мин), в колонках с соотношением $d:h$ как 1 : 7;

4) десорбция триптофана 5%-ным водным раствором аммиака в изопропиловом спирте со скоростью 1—3 мл/(см²·мин); элюируется до 90—92,5% сорбированного триптофана;

5) 5—10-кратное упаривание элюата при температуре 60—70° С в вакууме;

6) охлаждение концентрата до температуры 4—6° С, образование кристаллов триптофана;

7) отделение кристаллов триптофана от маточного раствора, промывка их этиловым спиртом и сушка при температуре 60° С.

Сухой препарат *L*-триптофана, полученный по этой схеме, является техническим. Его выход по триптофану составляет 40—45% от общего содержания аминокислоты в культуральной жидкости.

Для получения высокоочищенного препарата *L*-триптофана промытые этиловым спиртом кристаллы растворяют и перекристаллизовывают из 65%-ного этилового спирта или же из 60%-ного изопропилового спирта. Выпавшие кристаллы *L*-триптофана отделяют от маточного раствора и высушивают. Получаемый таким образом препарат *L*-триптофана имеет чистоту химического реактива.

Отходы при производстве очищенного препарата *L*-триптофана, такие, как биомасса продуцента, маточные растворы после кристаллизации при получении технического препарата, могут быть присоединены к культуральной жидкости при производстве кормового концентрата триптофана, так как они содержат заметные количества триптофана.

Возможен и другой способ получения *L*-триптофана без введения в процесс предшественника. Во ВНИИгенетика в настоящее время селекционированы новые штаммы спороносных бактерий, которые способны образовывать при глубинном культивировании их до 10 г на 1 л культуральной жидкости.

Таким продуцентом является Bac. subtilis ВНИИгенетика-3557. Выращивание его ведется на среде следующего состава (в %): сахароза техническая — 10; кукурузный экстракт — 2; калий фосфорнокислый однозамещенный — 0,06; калий фосфорнокислый двузамещенный — 0,14; магний сернокислый — 0,1; хлористый натрий — 0,05; мочевина — 0,5. Посевной материал выра-

щивается в 2—3 стадии на среде, состоящей из (в %): сахарозы — 5; кукурузного экстракта и калиевых солей — в том же соотношении, что и в производственной среде. Доза посевного материала в возрасте 18—20 ч вносилась в ферментатор в количестве 5—10%. Длительность культивирования 48 ч при температуре 37° С, аэрация среды осуществлялась до значения 3,6—4,0 г O_2/(л·ч).

Такая культуральная жидкость с содержанием *L*-триптофана до 10 г/л может быть источником получения как технического кормового препарата *L*-триптофана, так и для получения кристаллического препарата по схеме, близкой к ранее описанной.

Часть V

ОХРАНА ТРУДА И ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ПО ПРОИЗВОДСТВУ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЛИПИДОВ

Глава 1. ОХРАНА ТРУДА

Предприятия по производству белковых препаратов, аминокислот и липидов одновременно являются производствами химического и микробиологического профилей, так как в технологических процессах широко используются щелочи, кислоты, различные соли, а также микроорганизмы, которые могут неблагоприятно влиять на здоровье работающих. Некоторые получаемые и применяемые в технологическом процессе продукты пожаро- и взрывоопасны. Поэтому на подобных предприятиях важное место уделяется мероприятиям по охране труда и технике безопасности.

§ 1. ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ОХРАНЫ ТРУДА И ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Положения охраны труда на предприятиях микробиологического синтеза кормовых белков, липидов и аминокислот состоят из двух основных тесно связанных частей:

1. Противопожарная техника и техника безопасности, включающие разработку условий и осуществление организационных и технических работ по созданию безопасных условий труда, предотвращению пожаров и взрывов, а также обеспечению нормальных санитарно-гигиенических условий труда.

2. Трудовое законодательство, соблюдение правовых норм. Основные требования по технике безопасности предусмотрены Правилами безопасности для производств микробиологической промышленности, разработанными ВНПО «Гидролизпром» и институтами ВНИИсинтезбелок, ВНИИбакпрепарат и ВНИИбиотехника и

изданными в 1976 г. издательством «Недра» (Москва).

Правила безопасности для производств микробиологической промышленности распространяются на проектирование, строительство, эксплуатацию и реконструкцию предприятий микробиологической промышленности, в том числе: ...б) белковых препаратов на гидролизных средах и сульфитно-спиртовой барде; ...е) белковых препаратов из углеводородного сырья...; н) аминокислот.

На цехи и отделения указанных производств, в которых размещены взрывоопасные и взрывопожароопасные производства, распространяется действие «Правил безопасности во взрывоопасных и взрывопожароопасных химических и нефтехимических производствах» (ПБВХП — 74).

«Правила безопасности для производств микробиологической промышленности» состоят из следующих разделов.

Раздел первый. Общие положения.

Раздел второй. Территория, здания и сооружения. Раздел предусматривает оптимальную планировку территорий, зданий и сооружений, дорог и проездов между зданиями, размещение вспомогательных цехов, вентиляционных камер и другого оборудования, обеспечивающие безопасные условия работы.

Раздел третий. Включает подразделы: отопление и вентиляция; водоснабжение и канализация; освещение.

Раздел четвертый. Технологическая часть. Этот раздел включает меры по обеспечению безопасной работы в основном технологическом процессе, а именно размещение и монтаж основного технологического оборудования, трубопроводов, рабочих мест, и необходимые требования для их безопасной эксплуатации.

В четвертый раздел входят также мероприятия по безопасной работе на оборудовании и работе во вспомогательных отделениях, сырьевом цехе, гидролизном отделении, кислотной станции, отделении нейтрализации, отделении приготовления растворов известкового молока, питательных солей, сред и заторов, бродильном отделении, дрожжевом, ферментаторном и озонаторном отделениях, отделении сепарации, центрифугирования и фильтрации, цехах экстракции, отделениях сушки, стандартизации, фасовки и упаковки готового продукта и др.

Раздел пятый. Контрольно-измерительные приборы, средства автоматизации, производственная сигнализация и связь.

Раздел шестой. Склады готовой продукции. Склады растворителей. Склад парафинов. Склад концентрированных кислот. Склад аммиачной воды.

Раздел седьмой. Электротехническая часть.

Раздел восьмой. Противопожарные мероприятия.

Раздел девятый. Средства индивидуальной защиты.

Раздел десятый. Газоспасательная служба (ГСС).

Раздел одиннадцатый. Ответственность за нарушения правил безопасности.

§ 2. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И МЕРОПРИЯТИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

Технологический процесс получения белковых препаратов и липидов включает следующие основные операции: ферментацию, выделение дрожжей, экстракцию и сушку.

Процесс ферментации проводится в дрожжерастильных аппаратах различной конструкции, обычно устанавливаемых вне зданий. Для исключения загрязнений атмосферного воздуха на выходе из ферментаторов воздух проходит обеспложивающие фильтры. Выделение дрожжей из дрожжевой бражки осуществляется на флотаторах, сепараторах с последующими операциями упаривания и сушки для получения товарных дрожжей. Для выделения липидов из дрожжей дополнительно вводится операция экстракции липидов. Эти операции проводятся в основных производственных зданиях.

В процессе флотирования верхний слой дрожжевой суспензии отбирается и подается далее на сепараторы. а нижний слой сливается и используется вторично на приготовление питательных сред или раствора питательных солей. Остаток, содержащий органические соединения, направляется на очистные сооружения или же на упаривание, а затем сжигается. Остаток, содержащий минеральные соединения, может быть использован в качестве удобрения. Отделение дрожжей на сепараторах является одним из опасных узлов в этой схеме. Сепараторы, действующие по принципу центрифугирования, создают при работе большой шум, достигающий

110 — 120 дБ (децибел). Плохо затянутые муфты и другие неисправности на сепараторах, работающих с частотой вращения 5000 — 6000 мин$^{-1}$, могут быть причиной серьезных аварий и несчастных случаев. Кроме того, в сепарационном отделении при открытых лотках возможно выделение в воздух помещения дрожжевых клеток, а также других веществ в зависимости от состава сепарируемой жидкости.

Сепарированием доводят концентрацию дрожжей до 14—15% по сухой массе. Дальнейшее обезвоживание осуществляется на вакуум-выпарной установке, где концентрация дрожжевой массы повышается до 22 — 25% сухих веществ. Сушка дрожжей производится на распылительных сушилках, горячий воздух в которых имеет температуру 280 — 300° С. Поступающая на сушку дрожжевая суспензия распыляется в сушильной камере устройством, вращающимся с частотой 10000 — 12000 мин$^{-1}$, или форсунками, работающими под давлением $(2 \div 3)\ 10^5$ Па. При сушке дрожжей после фильтрации на вальцовых сушилках для прогрева барабана используется пар давлением $(3 \div 4)\ 10^5$ Па. На всех этих узлах опасны горячие поверхности теплообменной аппаратуры и трубопроводов, растворы каустической соды, применяемой для промывки, а также вращающиеся механизмы.

Дрожжевая пыль в распылительной сушилке на пути подачи на фасовку и на фасовке создает условия возникновения взрывоопасных смесей с воздухом. Кроме того, дрожжи являются диэлектриком, и в результате движения их возможно образование зарядов статического электричества. Поэтому отделения сушки и фасовки относятся к категории взрыво- и пожароопасных помещений.

Процесс витаминизации дрожжей, заключающий в переводе содержащегося в дрожжах эргостерина в витамин D_2, связан с облучением ультрафиолетовыми лучами. При работе установок облучения наблюдается повышение содержания озона в воздухе помещений. Такие помещения должны обеспечиваться эффективными вентиляционными системами. Помимо основных технологических процессов имеется ряд вспомогательных операций, к числу которых относятся отделения подготовки сырья, известкового молока для нейтрализации,

питательных солей, раствора каустической соды для мытья оборудования. Каждая из этих операций связана со специфическими условиями техники безопасности.

Особую опасность на предприятиях микробиологической промышленности представляет воздух заводских помещений. Это прежде всего относится к отделениям складских помещений и цехам приготовления питательных сред (содержание сухих компонентов сред), отделениям выделения и экстракции (культура продуцента, органические растворители), отделениям сушки, фасовки и хранения готовой продукции (мельчайшие частицы порошкообразных препаратов, споры и конидии продуцентов).

Для уменьшения запыленности заводских помещений предусматривается герметизация отдельных помещений и оборудования.

При отсутствии на предприятии специальных герметизирующих устройств в местах пыления и при нарушении нормальной работы приточно-вытяжной вентиляции во всех помещениях содержание органической пыли повышается до 80 — 125 мг/м³. Пыль в такой концентрации не только создает антисанитарные условия работы, но и значительно превышает нормы взрывоопасности.

В случае невозможности обеспечения герметичности оборудования устанавливают устройства с индивидуальной аспирацией узла. Операции, связанные с пылевыделением, необходимо изолировать от других помещений, по возможности механизировать и автоматизировать.

Нормальные условия для работающих на предприятиях микробиологической промышленности поддерживаются с помощью приточно-вытяжной вентиляции, обеспечивающей 4—8-кратный воздухообмен в вентилируемом помещении. Воздух, подаваемый в рабочие помещения, должен иметь следующие характеристики: относительная влажность 60—65%, температура 18—20°C, отсутствие пыли. Удаляемый из помещений воздух, если есть опасность его загрязнения микроорганизмами, очищают на масляных и обеспложивающих фильтрах или на фильтрах типа ФТО-1000 или ФТО-750; если воздух просто запылен, его очищают на обычных масляных фильтрах, циклонах и рукавных фильтрах.

На предприятиях микробиологической промышленности должен осуществляться постоянный контроль за наличием в воздухе токсических газов и паров. Предельно допустимые концентрации химических веществ в воздухе производственных помещений устанавливаются соответствующими нормами:

Вещество	Предельно допустимая концентрация, мг/м³	Вещество	Предельно допустимая концентрация, мг/м³
Аммиак	20	Уксусная кислота	5
Ацетон	200	Углеводороды	300
Бензин-растворитель	300	Пыль стеклянного и минерального волокна	3
Бензол	20	Антибиотик	0,3
Окись углерода	20	Метиловый спирт	50
Пиридин	5	Этиловый спирт	1000
Ртуть металлическая	0,01	Бутиловый спирт	200
Серная кислота, серный ангидрид	1		
Соляная кислота	5		

Особенностью микробиологического производства является присутствие в воздухе микроорганизмов-продуцентов.

Применяемые в качестве продуцентов кормового белка и липидов дрожжеподобные грибы рода Candida относятся к аспорогенным грибам, они являются одноклеточными микроорганизмами, имеющими размер клеток от 2—5 до 12—16 мкм и могут являться возбудителями болезни, носящей название кандидоза. Эти микроорганизмы относятся к условно-патогенным, могут развиваться на кожных покровах, слизистых оболочках и в желудочно-кишечном тракте. Отдельные виды дрожжеподобных грибов отличаются по своей патогенности: наибольшей патогенностью обладает вид C. albicans, далее в нисходящем порядке виды C. tropicalis, C. pseudotropicalis, C. guilliermondii и т. д.

Из наиболее распространенных производственных культур дрожжеподобных грибов штаммы, обладающие патогенными свойствами, в основном встречаются только среди вида Candida tropicalis, а штаммы других видов в большинстве малопатогенные или совсем непатогенные.

Экспериментальное исследование отдельных производственных штаммов дрожжеподобных грибов выявило неодинаковую степень патогенности не только от-

дельных видов дрожжеподобных грибов, но и различных штаммов, принадлежащих к одному виду.

Предрасположениями к заболеванию кандидозом являются истощение, ослабление организма, авитаминоз, нарушение обмена, длительное применение антибиотиков и кортикостероидов, нарушение целостности кожных покровов и слизистых оболочек. На предприятиях микробиологической промышленности проводятся периодические профилактические медицинские осмотры с целью предупреждения и своевременного выявления заболеваний.

Глава 2. ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В настоящее время вопросы рационального использования водных ресурсов и охраны водоемов от загрязнений сточными водами приобрели первостепенное значение. Эффективная охрана водоемов от загрязнений не может быть обеспечена без надлежащей очистки сточных вод, особенно промышленных, для совершенствования которой необходимо улучшение существующих и разработка новых физико-химических и биологических способов очистки.

§ 1. ПРОМЫШЛЕННЫЕ СТОКИ

В производственных процессах получения белковых препаратов, аминокислот и липидов промышленные стоки делятся на условно-чистые и загрязненные.

К условно-чистым относятся воды, прошедшие теплообменные аппараты, в них не происходит изменения состава, а только температуры. Остальные производственные стоки относятся к загрязненным.

Загрязненные промышленные стоки характеризуются присутствием органических и неорганических веществ.

Загрязненность промышленных стоков и расход кислорода на процесс бактериального окисления органических веществ характеризуются показателями БПК (биологическое потребление кислорода, выражаемое в миллиграммах O_2 на 1 л анализируемой жидкости): $БПК_5$ (при выдерживании пробы в течение пяти суток — пятисуточное БПК); $БПК_{20}$ (при 20-суточной выдержке, часто называемое БПК полным).

Зная количество содержащихся веществ и их характеристики по БПК, можно вычислить БПК смеси. Но когда в смеси присутствует большое количество веществ или точно не известен ее состав, этого сделать нельзя. Поэтому обычно проводят аналитическое определение БПК, дающее суммарное его значение, и тогда не требуется уточнения химического состава смеси.

Характеристика сточных вод и их загрязненность

Основным загрязненным стоком производства кормовых дрожжей и липидов является культуральная жидкость после отделения дрожжей. Она составляет по объему 30—35% от общего объема стоков завода, по загрязненности — 70—90% от общего количества загрязнений. Качественный состав сточных вод изменяется в зависимости от перерабатываемого сырья, вида вырабатываемой продукции, технологических режимов работы, расхода свежей воды. Примерный химический состав отделяемой последрожжевой культуральной жидкости и общезаводского стока гидролизно-дрожжевых заводов приведен в табл. 55.

Таблица 55

Наименование показателей	Последрожжевая жидкость	Общий заводской сток
Температура, °C	35—39	17—30
pH	4,2—4,5	5,3—6,2
$БПК_5$, мг O_2/л	4700—6300	1800—3000
БПК полное, мг O_2/л	8500—10 400	2700—4600
ХПК, мг O_2/л	15 300—16 000	6000—6800
Общие РВ, мг/л	1900—3000	350—850
Кислотность, мг/л	190—390	80—100
Летучие кислоты, мг/л	120—550	160—450
Фурфурол, мг/л	70—145	12—120
Фосфор (P_2O_5), мг/л	25—90	23—45
Азот общий, мг/л	27—100	70—425
Взвешенные вещества, мг/л		
общие	1570—2830	550—1330
минеральные	300—400	140—220
органические	1270—2400	400—1110

Сточные воды гидролизно-дрожжевых заводов имеют коричневый цвет, который обусловлен присутствием в них гуминово-лигниновых веществ. Они отличаются большим содержанием органических веществ, часть которых составляют сахара и органические кислоты, в основном пентозы (ксилоза и арабиноза) и уксусная кислота. В незначительном количестве в сточных водах содержатся муравьиная, левулиновая и альдобиуроновые кислоты и гексозы. В стоках присутствуют и ядовитые примеси — фурфурол, оксиметилфурфурол, формальдегид, гуминово-лигниновые коллоидные вещества, терпены. Помимо них в стоках находятся в небольшом количестве азотистые и фосфорные соединения, а также продукты обмена веществ микроорганизмов — аминокислоты, янтарная, молочная и другие кислоты. Все эти вещества определяют основные показатели сточных вод гидролизно-дрожжевых и в какой-то мере других дрожжевых заводов: значительную загрязненность, повышенную кислотность и токсичность, высокое биохимическое потребление кислорода.

Некоторыми особенностями обладают сточные воды заводов по производству кормовых дрожжей на углеводородах нефти, они содержат остаточные количества *н*-парафинов. При работе по технологической схеме с рециркуляцией в них содержатся также повышенные количества ароматических углеводородов, накапливаемых при возврате отработанной культуральной жидкости в ферментатор.

Сточные воды после экстракции липидов представляют собой взболтанную эмульсию хлопьевидных взвешенных веществ. Они мутные, отличаются резким запахом сероводорода и бензина, pH 5,0—6,0, окисляемость высокая — до 15 000 мг O_2/л, $БПК_5$ достигает 12 000 мл/л. Содержание жиров в виде взвесей или эмульсии составляет 400—700 мг/л. Стоки сильно загрязнены органическими веществами, быстро загнивают.

Количество сточных вод и их загрязненность

Общее количество загрязненных промышленных стоков для дрожжевых заводов производительностью 80 000 т дрожжей в год составляет в среднем в зависимости от времени года 45—55 тыс. м³ в сутки. Основ-

ное количество загрязненных стоков составляет отработанная культуральная жидкость —120—140 м³ на 1 т сухой массы дрожжей, общих же стоков — 170—220 м³ на такую же массу дрожжей. Но в сбрасываемой культуральной жидкости содержатся основные загрязнения: по взвешенным веществам — до 75%, по $БПК_5$ — до 93—94%.

Количество взвешенных веществ в промышленных сточных водах обычно составляют 100—125 кг на 1 т сухой биомассы, из них только 25 кг приходится на долю минеральных веществ. Основное количество минеральных веществ составляет гипс, а органических — лигнин.

Шламосодержащие стоки удаляются с территории завода на специально отведенные для этой цели площадки (шламоотвалы), горючие фракции подлежат сжиганию.

Возможности снижения количества загрязнений и объема сточных вод

Из общего количества органических веществ, содержащихся в исходных питательных средах, в процессе производства используется 75—80%, а остальное (25—20%) уходит с отработанными сточными водами. Для очистки таких загрязненных стоков требуются специальные сооружения, затраты на которые составляют 40—50% от капиталовложений, требующихся для создания основного процесса производства. Высок также уровень эксплуатационных расходов.

Поэтому самым актуальным вопросом является вопрос снижения количества загрязнений в производственных сточных водах. В большинстве случаев на заводах по производству кормовых дрожжей, аминокислот и липидов количество загрязнений по $БПК_5$ и взвешенным веществам в 1,5—2 раза превышает нормально допустимые величины.

Снижение количества загрязнений можно достигнуть при внедрении новых технологических приемов и процессов, например: при введении циклов повторного использования сточных вод, в частности использование отработанной культуральной жидкости на разбавление сусла перед выращиванием дрожжей с рециркуляцией на процесс гидролиза, на приготовление растворов пи-

тательных солей и известкового молока; использование лютера ректификационных колонн фурфурального цеха взамен воды, идущей на гидролиз. В результате этого количество отработанной культуральной жидкости уменьшается почти вдвое.

§ 2. СПОСОБЫ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД

Целью очистки производственных сточных вод является удаление из них взвешенных и растворимых веществ до предельно допустимых концентраций, значения которых заранее регламентируются. После сброса очищенных сточных вод содержание взвешенных веществ в водоеме не должно увеличиваться более чем на 0,25—0,75 г/м³, а содержание органических веществ (по $БПК_{20}$) не должно превышать 3—6 г/м³ в водоемах для питьевого и культурно-бытового водопользования и 2 г/м³ в водоемах рыбохозяйственного значения, в которых, кроме того, содержание растворенного кислорода не должно падать ниже 4—6 мг/л.

Способы очистки сточных вод разделяются на механические (отстаивание), механико-химические (коагуляция, нейтрализация с последующим отстаиванием), физико-химические (ионный обмен, сорбция и др.), биохимические, термические (тепловые).

Принципиальные технологические схемы очистки загрязненных сточных вод

Наиболее распространенная схема очистки включает первичную и вторичную очистку (рис. 119). Первичная очистка предусматривает механическое отделение загрязнений (процеживание и отстаивание) и включает задержание крупных примесей на механизированных решетках, измельчение на дробилках, смешение с общим потоком сточных вод, и отделение зернистых минеральных загрязнений в песколовушках. Вторичная очистка включает очистку сточных вод в системе очистных сооружений (биоокислителях) либо очистку сточных вод в естественных условиях на полях орошения.

Принципиальная технологическая схема очистки включает следующее основное оборудование.

Механизированные решетки предназначены для удаления крупных и крупнозернистых примесей, песка и

других тяжелых веществ. Основным конструктивным элементом решеток является ряд прутьев различной формы, поставленных наклонно или вертикально — перпендикулярно направлению потока в канале. Для заводов белковых препаратов, где нет крупных примесей, необходимость в механизированных решетках отсутствует.

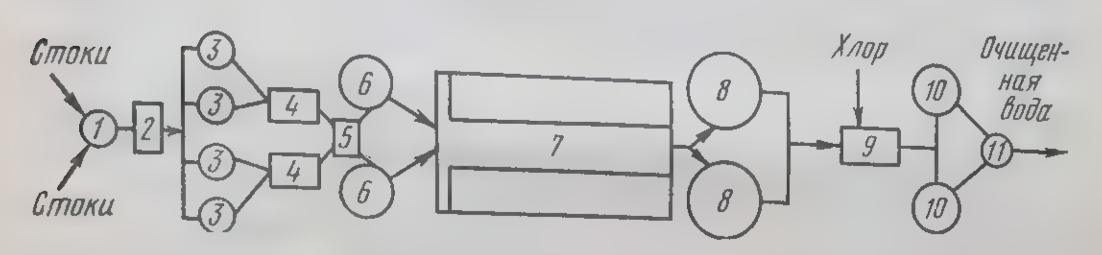


Рис. 119. Технологическая схема очистки стоков:

1 — колодец-сборник; *2* — механические решетки; *3* — песколовушки; *4* — предаэраторы; *5* — распределитель; *6* — первичные отстойники; *7* — аэротенк; *8* — вторичные отстойники; *9* — ершовый смеситель; *10* — контактные осветлители; *11* — выпускной колодец.

Песколовушки спаренные, горизонтальные служат для удаления из сточных вод зернистых минеральных примесей. Промышленные песколовушки с круговым движением воды представляют собой конусообразный резервуар, в верхней части которого по периметру с внутренней стороны проходит осадочный желоб. В нижней части желоба, по которому движется жидкость, имеется кольцевая щель, через которую оседающий песок проваливается в бункер. В бункере установлен гидрозатвор для выгрузки осевшего песка.

Принцип действия песколовушек основан на самопроизвольном осаждении частиц взвеси под действием силы тяжести.

Предаэратор предназначен для предварительной кратковременной аэрации с целью более полного осветления сточных вод. В процессе аэрации происходят флокуляция и коагуляция мельчайших частиц нерастворенных в сточной воде примесей, плотность которых мало отличается от плотности самой воды. В результате эти частицы укрупняются и быстрее оседают при отстаивании. Для повышения эффективности действия и снижения БПК сточных вод вводится биокоагуляция

(предварительная аэрация с добавлением ила из вторичных отстойников). Конструктивно предаэратор представляет собой аэротенк.

Отстойники радиальные диаметром 16 м применяют для осаждения из сточных вод мелкой взвеси. Длительность пребывания сточных вод в отстойниках колеблется от 1 до 2 ч. Условием хорошей работы отстойника является равномерное прохождение через него сточных вод, что достигается соответствующей конструкцией впускных и выпускных отверстий и подбором оптимального соотношения между основными размерами отстойника.

В первичных радиальных отстойниках осаждается сырой ил и избыточный активный ил, направленный ранее в предаэратор. Смесь полученных осадков направляют на иловую насосную станцию первичных отстойников, откуда плунжерными насосами по напорному трубопроводу — на иловые площадки, где она подсушивается до влажности 70—80%.

Аэротенк предназначен для сбора стоков после первичных отстойников. Работа аэротенка основана на использовании биохимического окисления органических веществ аэробными микроорганизмами, колонии которых образуют так называемый активный ил. Для снабжения микроорганизмов кислородом применяют непрерывную искусственную аэрацию смеси сточных вод и активного ила путем подачи в смесь сжатого воздуха. Одновременно аэрация обеспечивает непрерывное перемешивание смеси сточных вод и активного ила, повышает контакт жидкости и ила. В основу системы аэрации аэротенков положена пневматическая система. Диспергирование воздуха достигается с помощью керамических диффузоров из пластин КМ 300×300×35 мм с размером пор 150—200 мкм.

Вторичные радиальные отстойники служат для осаждения ила и осветления сточных вод после биологической очистки. Конструкция вторичных отстойников аналогична первичным. Для сбора и отвода ила используется илосос, выполненный в виде илоприемной трубы, оборудованной по всей длине сосунами. При вращении фермы с илососом активный ил забирается и отводится со всей площади отстойника в сборник ила, расположенный рядом с отстойниками.

Ершовый смеситель предназначен для интенсивного перемешивания воды, прошедшей очистку, с хлорной водой, которая поступает из хлораторной. Хлораторная представляет собой железобетонный канал, в котором устроены пять вертикальных перегородок, установленных под углом к стенкам канала.

Контактные резервуары осуществляют 30-минутный контакт хлора с водой, прошедшей очистку. После контактного резервуара очищенная вода спускается в естественные водоемы.

Степень очистки, предельное содержание остаточных веществ и температура воды, спускаемой в водоемы, согласовывается с Государственной санитарной инспекцией и Государственной инспекцией по охране рыбных запасов (СН 245—71).

Повышение эффективности биохимической очистки сточных вод производства белковых препаратов на углеводородах нефти

При производстве белковых препаратов на углеводородах нефти при возврате 80% отработанной культуральной жидкости в ферментатор в последрожжевой бражке накапливаются наиболее трудно окисляемые дрожжами углеводороды, в том числе и ароматические.

Для повышения эффективности биохимической очистки сточных вод, содержащих неутилизированные углеводороды, недостаточно адаптации активного ила к стокам. Необходимо подобрать специфическую микрофлору активного ила из микроорганизмов, хорошо развивающихся на средах с парафинами.

Для создания направленного биоценоза из активного ила, адаптированного к стокам производства белковых препаратов из очищенных жидких парафинов, рекомендуется применение двухступенчатой очистки с подсевом во вторую ступень активных культур микроорганизмов.

При этом на первой ступени окисляются легкодоступные источники углерода, присутствующие в среде, а на второй ступени начинается окисление углеводородов. Применение активного биоценоза на второй ступени биологической очистки позволяет в значительной степени улучшить ее качество. При двухступенчатой

очистке сточных вод производства белковых препаратов на углеводородах при постоянном расходе воздуха на первой ступени очистки и времени аэрации в аэротенке 4 ч наблюдается снижение содержания углеводородов на 30,0%, а на второй ступени при времени аэрации 6 ч — на 60,0%.

Очистка сточных вод в естественных условиях на полях орошения или фильтрации

Полями орошения называют специально подготовленные участки земли, на которые периодически спускаются сточные воды.

На полях орошения сточные воды распределяются железобетонными лотками, прокладываемыми по земляным валам. Вблизи участка полей орошения сточные воды фильтруются через почву. В процессе фильтрации растворенные и коллоидные органические загрязнения адсорбируются твердыми частицами почвы. На поверхности почвы в большом количестве развиваются аэробные микроорганизмы, образуя биологическую пленку. Под действием этих микроорганизмов в присутствии кислорода воздуха адсорбированные органические вещества окисляются, превращаясь в минеральные вещества, которые можно использовать как ценное удобрение для сельскохозяйственных культур. Растения, выращиваемые на этих участках, используют также влагу промышленных стоков. На полях орошения целесообразно очищать сточные воды гидролизных заводов, перерабатывающих сельскохозяйственные отходы и расположенных в южных районах страны, например в Средней Азии, где не хватает поливной воды и где нет опасности заболачивания почвы и ее закисления при спуске кислых сточных вод. Кроме того, сточные воды заводов, перерабатывающих сельскохозяйственные отходы, содержат значительное количество азотсодержащих веществ, являющихся хорошим удобрением.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Аиба Ш., Хемфри А., Миллис М. Биохимическая технология и аппаратура: перевод с англ. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 287 с.

Андреев А. А., Брызгалов Л. И. Производство кормовых дрожжей. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Лесная промышленность, 1970. — 296 с.

Бекер В. Ф., Бекер М. Е. Лизин микробного синтеза. — Рига: Зинатне, 1975. — 125 с.

Бекер М. Е. Введение в биотехнологию: перевод с латышского, пер. И. А. Графф. — М.: Пищевая промышленность, 1978. — 232 с.

Биккулов А. З., Силищев Н. Н., Фролов В. В. Производство белка из углеводородов нефти (Подготовка сырья). Учебное пособие. — Уфа: Уфимский нефтяной институт, 1976. — 88 с.

Буканова В. И., Тарутина Т. И. Способы очистки сточных вод дрожжевого производства. Обзор. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, 1973. — 40 с.

Градова Н. Б., Диканская Э. М., Михалева В. В. Использование углеводородов дрожжами. Обзор. — М.: ОНТИТЭИ микробиологической промышленности, 1971. — 120 с.

Грачев Ю. П. Математические методы планирования эксперимента. — М.: Пищевая промышленность, 1979. — 199 с.

Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 392 с.

Григорян А. Н., Горская Л. А. Биосинтез на природном газе. Обзор Серия I. — М.: ОНТИТЭИ микробиологической промышленности, 1975. — 112 с.

Елинов Н. П. Общие закономерности строения и развития микробов — продуцентов биологически активных веществ. — Л.: Медицина. Ленинградское отделение, 1977. — 288 с.

Забродский А. Г. Производство кормовых дрожжей на мелассно-спиртовых заводах. — М.: Пищевая промышленность, 1972. — 170 с.

Зайцева З. М. Биосинтез лизина промышленными микроорганизмами — Успехи микробиологии, вып. II, 1976, с. 152—173.

Залашко М. В., Залашко Л. С. Микробный синтез на молочной сыворотке. — Минск: Наука и техника, 1976. — 274 с.

Контроль производства хлебопекарных дрожжей/[О. А. Бакушинская, Л. Д. Белова, В. И. Буканова, М. Ф. Лозенко, Н. М. Семихатова. — М.: Пищевая промышленность, 1978. — 168 с.

Лобанок А. Г., Бабицкая В. Г. Микробиологический синтез белка на целлюлозе. — Минск: Наука и техника, 1976. — 232 с.

Мартыненко К. Д., Ефимов В. А. Технологическое оборудование гидролизного производства. — М.: Лесная промышленность, 1973. — 344 с.

Межиня Г. Р., Дунце М. Э. Новые виды сырья для микробиологических производств. Обзор. Серия II. — М.: ОНТИТЭИ микробиологической промышленности, 1978. — 72 с.

Микробиологический биосинтез аминокислот. (Сборник АН ЛатвССР, Ин-т микробиологии им. А. Кирхенштейна)/[редкол.: П. А. Кукайн, Ю. О. Якобсон, А. Э. Дук]. — Рига: Зинатне, 1977.— 79 с.

Микробные биомассы и их метаболиты. (Сборник АН ЛатвССР, Ин-т микробиологии им. А. Кирхенштейна)/[редкол.: П. А. Кукайн и др.]. — Рига: Зинатне, 1972. — 130 с.

Новаковская С. С. Справочник технолога дрожжевого производства. — М.: Пищевая промышленность, 1973. — 288 с.

Палагина Н. К. Технологические расчеты дрожжевого производства. — М.: Пищевая промышленность, 1978. — 144 с.

Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: перевод с англ./под ред. И. Л. Работновой. — М.: Мир, 1978. — 332 с.

Печуркин Н. С. Популяционная микробиология. — Новосибирск: Наука. Сибирское отделение, 1978. — 278 с.

Получение кормовых дрожжей из торфа/под ред. В. Е. Раковского. — Минск: Наука и техника, 1977. — 229 с.

Правила безопасности для производств микробиологической промышленности/[ред. кол.: В. Д. Кравченок и др.]. — М.: Недра, 1976. — 48 с.

Продукты микробного синтеза на торфяных субстратах/под ред. М. В. Залашко. — Минск: Наука и техника, 1978. — 234 с.

Рубан Е. Л. Микробные липиды и липазы. — М.: Наука, 1977. — 216 с.

Стахеев М. В. Культивирование дрожжей и грибов — продуцентов протеина на отходах переработки картофеля. — Минск: Наука и техника, 1978. — 168 с.

Технология гидролизных производств/[В. И. Шарков, С. А. Сапотницкий, О. А. Дмитриева, И. Ф. Туманов]. — М.: Лесная промышленность, 1973.—407 с.

Федосеев К. Г. Физические основы и аппаратура микробного синтеза биологически активных соединений. — М: Медицина, 1977. — 304 с.

Ферментация (Сборник АН ЛатвССР, Ин-т микробиологии им. Кирхенштейна)/под ред. Д. Я. Креслиня и др. — Рига: Зинатне, 1974. — 231 с.

Черкинский С. Н. Санитарные условия спуска сточных вод в водоемы. — М.: Издательство литературы по строительству, 1971.— 208 с.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ III

ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ ЛИПИДОВ

ЧАСТЬ IV
ТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ

ЧАСТЬ V

ОХРАНА ТРУДА И ОХРАНА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ПРЕДПРИЯТИЯХ ПО ПРОИЗВОДСТВУ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЛИПИДОВ

Ирина Михайловна Грачева
Нина Николаевна Гаврилова
Людмила Афанасьевна Иванова

ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, АМИНОКИСЛОТ И ЖИРОВ

Редактор И. П. Вейшторд
Художник Е. Н. Волков
Художественный редактор В. А. Чуракова
Технический редактор Л. И. Кувыркина
Корректоры В. Б. Грачева, Н. П. Багма

ИБ № 1252

Сдано в набор 17.12.79. Подписано в печать 02.07.80. Т-08671. Формат 84×108[1]/32. Бумага типографская № 2. Литературная гарнитура. Высокая печать. Объем 14,0 печ. л. Усл. печ. л. 23,52. Уч.-изд. л. 24,70. Тираж 4500 экз. Заказ 212. Цена 1 р. 20 к.

Издательство «Пищевая промышленность», 113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

Владимирская типография «Союзполиграфпрома» при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли
600000, г. Владимир, Октябрьский проспект, д. 7





ТЕХНОЛОГИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ


www.youtube.com
Resident Evil 4: SPEEDRUN TODAS AS CAMPANHAS - HD PROJECT (2K60FPS) - YouTube
69K отзывов
YouTube
Введите запрос
resident evil
HD PROJECT
18:06
30 июля, 00:00
Напоминание включено
Resident Evil 4: SPEEDRUN TODAS AS CAMPANHAS - HD PROJECT (2K60FPS)
5 зрителей ждут начала
24
НЕ НРАВИТСЯ
ПОДЕЛИТЬСЯ
СОХРАНИТЬ
Caique Gamer
SE INSCREVAM NO CANAL ...
Caique Gamer